

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**PRODUCCIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA
EN *Escherichia coli* MARCADA CON SmbP Y CusF3His+**

POR

DAVID ANTONIO PÉREZ PÉREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA
APLICADA**

OCTUBRE, 2017

PRODUCCIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA
EN *Escherichia coli* MARCADA CON SmbP Y CusF3His+

Aprobación de tesis:

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
Presidente

Secretario

Vocal

PRODUCCIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA EN
Escherichia coli MARCADA CON SmbP Y CusF3His+

Revisión de tesis

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
ASESOR

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez
COMITÉ TUTORIAL

Dr. José Rubén Morones Ramírez
COMITÉ TUTORIAL

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu
COMITÉ TUTORIAL

Dra. María Aracely Hernández Ramírez
SUBDIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo a mi querida familia:

A mi madre, mi padre, mi hermana, mis sobrinas

y sobre todo a mi esposa

Los amo profundamente.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron presentes durante la realización de este proyecto y durante mi desarrollo profesional.

A la escuela de graduados de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL por las instalaciones prestadas y los materiales brindados.

Al CONACyT por el soporte económico recibido.

Agradezco a mi asesor el Dr. Xristo Zárate Kalfópulos por todo su apoyo, paciencia y consejos durante estos dos años.

A mi comité tutorial conformado por el Dr. Edgar Allan Blanco Gámez, Dr. José Rubén Morones Ramírez y Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu por todas sus observaciones, correcciones y tiempo invertido en este proyecto.

También agradezco a la coordinadora del posgrado en Microbiología Aplicada la Dra. María Elena Cantú, por todo la ayuda que me brindo.

A todos los profesores del posgrado gracias por compartir sus conocimientos y ayudarme en mi formación académica.

A mi esposa Ivonne Stephany Ríos Ávila por siempre apoyarme, brindarme cariño y comprensión, ser mi soporte en los momentos difíciles y mi compañera de vida.

A mi familia por apoyarme siempre, a mis padres Ma. Del Carmen Pérez Martínez y Eduardo Pérez Quilantan por dedicar muchos años de su vida moldeando la mía, sin ustedes no estaría aquí en este momento.

A mis hermanos Bryan Daniel Santos Rodríguez, Jesús Enrique Cristerna Castro, Paul Yusef Verdines Rodríguez y Luis Abraham Garza Herrera.

A mi equipo de trabajo Arlette, Jessy, Tere, Claudia, Alma y Adriana. Gracias por toda su ayuda.

Al laboratorio tres, Paco, Javi, Albert, Dago, Pepi, Enrique, Lily y Ximena.

A mis compañeros de generación, Norbi, Lorelay, Silvia, Elida, Josué y Annette.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
CAPÍTULO 1	8
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Proteínas recombinantes	8
1.2 <i>Escherichia coli</i> como organismo hospedero para la producción de proteínas recombinantes	9
1.3 Proteínas de fusión	11
1.4 Hormona del crecimiento humana	12
CAPÍTULO 2	15
2. ANTECEDENTES	15
2.1 Las proteínas de fusión SmbP y CusF	15
2.2 Expresión de la hormona del crecimiento	16
CAPÍTULO 3	19
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
3.1 Hipótesis	19
3.2 Objetivo general	19
3.3 Objetivos específicos	19
CAPÍTULO 4	20
4. METODOLOGÍA DE TRABAJO	20
4.1 Obtención de gen de la hGH	21
4.2 Amplificación del ADN de PelB-SmbP y CusF3H+	22
4.3 Construcción de los plásmidos pET30a-PelB-SmbP y pET30a-CusF3H+	24
4.4 Construcción de los plásmidos pET30a-PelB-SmbP-hGH y pET30a-CusF3H+-hGH	26
4.5 Expresión de la hGH en <i>E. coli</i> BL21(DE3)	29
4.6 Purificación de la hGH	34
4.7 Cuantificación de proteínas por el método Bradford	37
4.8 Corte de la proteína de fusión	37
4.9 Segunda cromatografía de afinidad	38
CAPÍTULO 5	39
5. RESULTADOS	39

5.1 Secuencia de la hGH optimizada para su expresión en <i>E. coli</i>	39
5.2 Digestión del plásmido pUC57-hGH	40
5.3 Amplificación del ADN de PelB-SmbP y CusF3H+.....	40
5.4 Construcción de los plásmidos pET30a-PelB-SmbP-hGH y pET30a-CusF3H+-hGH.....	42
5.5 Secuenciación de las construcción pET30a-PelB-SmbP-hGH y pET30a-CusF3H+-hGH.....	44
5.5 Expresión piloto y análisis por SDS-PAGE de las construcciones pET30a-PelB-SmbP-hGH y pET30a-CusF3H+-hGH	46
5.6. Segunda expresión piloto de proteínas	47
5.7 Expresión de la hGH usando 1 L de medio de cultivo	48
5.8 Corte de la proteína de fusión	50
5.9 Segunda cromatografía de afinidad	52
5.10 Expresión a 1 L de medio de cultivo y purificación mediante IMAC empleando el sistema cromatográfico ÄKTA prime plus.....	53
5.11 Cromatografía de intercambio aniónico.....	55
5.12 Segunda expresión a 1 L de medio de cultivo y purificación mediante IMAC empleando el sistema cromatográfico ÄKTA prime plus.	56
5.13 Corte de la proteína de fusión	57
5.14 Segunda cromatografía de afinidad	59
CAPÍTULO 6	62
6. Discusiones	62
6.1 Discusión de resultados	62
CAPÍTULO 7	71
7.- CONCLUSIONES	71
CAPÍTULO 8	73
8. PERSPECTIVAS	73
CAPÍTULO 9	74
REFERENCIAS	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la amplificación de PelB-SmbP y CusF3H+	23
Tabla 2. Secuencia de aminoácidos de CusF3H+ y PelB-SmbP	41
Tabla 3. Datos de la curva de calibración para el método Bradford.....	51
Tabla 4. Absorbancias de PelB-SmbP-hGH y CusF3H+-hGH.....	51
Tabla 5 Datos de la curva de calibración para el método Bradford.....	58
Tabla 6. Absorbancias de PelB-SmbP-hGH.....	58
Tabla 7. Datos de la curva de calibración para el método Bradford.....	60
Tabla 8. Absorbancias de la hGH	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura primaria de la hGH.....	13
Figura 2. Estrategia general trabajo.....	20
Figura 3. Secuencia de la hGH optimizada para su expresión en E. coli.....	39
Figura 4. Gel de agarosa al 0.7% de la digestión de pUC57-hGH.....	40
Figura 5. Gel de agarosa al 0.7%. de la Amplificación de PelB-SmbP	41
Figura 6. Gel de agarosa al 0.7% de la Amplificación de CusF3H+	42
Figura 7. Gel de agarosa al 0.7% de la amplificación de pET30a-PelB-SmbP-hGH	43
Figura 8. Gel de agarosa al 0.7% de la amplificación de CusF3H+-hGH	44
Figura 9. Secuenciación de la construcción pET30a-PelB-SmbP-hGH	45
Figura 10. Secuenciación de la construcción pET30a-CusF3H+-hGH	45
Figura 11. Expresión piloto de la hGH con las proteínas de fusión PelB-SmbP y CusF3H+	46
Figura 12. Expresión piloto de la hGH con la proteína de fusión PelB-SmbP.....	47
Figura 13. Expresión piloto de la hGH con la proteína de fusión CusF3H+	48
Figura 14. Expresión a 1 L de cultivo con la proteína de fusión PelB-SmbP	49
Figura 15. Expresión a 1 L de cultivo con la proteína de fusión CusF3H+	50
Figura 16. Gráfica de la curva de calibración del método Bradford a 595 nm.	51
Figura 17. SDS-PAGE al 15% de la remoción de la proteína PelB-SmbP de hGH usando enteroquinasa de cadena ligera	52
Figura 18. SDS-PAGE al 15% de la remoción de la proteína CusF3H+ de hGH usando enteroquinasa de cadena ligera.....	53
Figura 19. Cromatograma de Afinidad con Ni(II) para PelB-SmbP-hGH	54
Figura 20. SDS-PAGE al 12% de la purificación de PelB-SmbP-hGH mediante cromatografía de afinidad	54
Figura 21. Cromatograma de intercambio aniónico para PelB-SmbP-hGH	55
Figura 22. SDS-PAGE al 12% de la purificación de PelB-SmbP-hGH mediante intercambio aniónico.....	56
Figura 23. SDS-PAGE al 12% de la purificación de PelB-SmbP-hGH mediante IMAC ..	57
Figura 24. SDS-PAGE al 12% de la purificación de PelB-SmbP-hGH mediante IMAC ..	57
Figura 25. Gráfica de la curva de calibración del método Bradford a 595 nm.	58
Figura 26. SDS-PAGE al 15% de la remoción de la proteína PelB-SmbP de hGH usando enteroquinasa de cadena ligera	59
Figura 27. Gráfica de la curva de calibración del método Bradford a 595 nm.	60

NOMENCLATURA

°C	Grado Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitros
µM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BL21(DE3)	Cepa <i>E. coli</i>
BSA	Albúmina de Suero Bovino
DH5α	Cepa <i>E. coli</i>
dNTP's	Desoxirribionucléotidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FPLC	Fast protein liquid chromatography
HCl	Ácido clorhídrico
IMAC	Immobilized metal affinity chromatography
IPTG	Isopropil-B-D-tiogalactopiranosido
kD	Kilodaltones
L	Litro
LB/Kan	Caldo Luria Bertani con kanamicina
M	Molar
mAu	Miliunidades de absorbancia
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
OmpA	Proteína de membrana externa A
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PeIB	Pectato liasa B
pmoles	Picomoles
RPM	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SmbP	Proteína pequeña de unión a metales
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
TGS	Tris-glicina-dodecilsulfato de sodio

RESUMEN

David Antonio Pérez Pérez

Fecha de graduación:

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: **PRODUCCIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA EN *Escherichia coli* MARCADA CON SmbP Y CusF3His+**

Número de páginas: 87

Candidato para el grado de
Maestría en Ciencia con orientación
en Microbiología Aplicada

Área de estudio: Microbiología Aplicada

Propósito y Método de Estudio: Actualmente alrededor de 200 proteínas han sido aprobadas como biofármacos y algunas otras se encuentran en estudios preclínicos y clínicos.

El coste principal en la producción de este tipo de proteínas en *E. coli* es la formación de cuerpos de inclusión y el proceso de purificación. Para disminuir los cuerpos de inclusión y facilitar la purificación se usan proteínas de fusión.

En este estudio se probaron dos nuevas proteínas de fusión PelB-SmbP y CusF3H+ para la producción de un metabolito de importancia farmacéutica como lo es la hGH.

La metodología consistió en: construcción de plásmidos, transformación en la cepa DH5 α , extracción de ADN plasmídico, transformación en la cepa BL21(DE3), expresión de proteínas, purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados y caracterización de la hGH.

Contribuciones y conclusiones: Se obtuvieron dos construcciones (PelB-SmbP-hGH y CusF3H+-hGH) para la producción de hGH en *E. coli*.

Tanto PelB-SmbP como CusF3H+ demostraron ser efectivas para la producción de hGH ya que con ellas se obtuvo proteína soluble.

Ya que las proteínas de fusión utilizadas en este proyecto son afines a diversos metales entre ellos Ni(II), se puede usar cromatografía de afinidad para su purificación facilitando en gran medida este proceso.

Este proyecto describe una estrategia eficiente para la expresión y purificación de la hGH.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Proteínas recombinantes

Las proteínas se han utilizado por más de 100 años para tratar o prevenir enfermedades en los seres humanos. Su uso comenzó a principios de 1890 con la "terapia sérica" para el tratamiento de la difteria y el tétanos [1].

Se les llama proteínas recombinante a aquellas proteínas que se obtienen al expresar un gen clonado en una línea celular distinta a la original [2].

Las primeras proteínas terapéuticas fueron versiones recombinantes de proteínas naturales, a las cuales le siguieron proteínas modificadas mediante glicosilación o conjugación con polietilenglicol [3].

Estas proteínas terapéuticas también llamadas biofármacos han ido desplazando poco a poco a las moléculas sintéticas tradicionales, se estima que en 10 años alrededor del 50% de los medicamentos en desarrollo serán biofármacos [4].

Actualmente alrededor de 200 proteínas han sido aprobadas como biofármacos y algunas otras se encuentran en estudios preclínicos y clínicos [2].

Las proteínas recombinantes se pueden producir en una amplia variedad de hospederos como son bacterias, levaduras, plantas (por ejemplo, arroz y tomate), células de mamífero, algas unicelulares e incluso por animales transgénicos [5].

Los tres sistemas de expresión más usados para la producción de biofármacos son *E. coli* (aprox. 31%), levaduras (*S. cerevisiae* y *P. pastoris* aprox. 15%) y células de mamíferos (aprox. 43%).

Todos estos sistemas de expresión tiene sus fortalezas y debilidades y su elección depende en gran medida de la proteína de interés que se quiere producir [6].

1.2 *Escherichia coli* como organismo hospedero para la producción de proteínas recombinantes

E. coli es un veterano en la producción de metabolitos de interés, hace ya varias décadas empezó su uso para la producción del aminoácido L-treonina y la síntesis recombinante de insulina humana. Debido a su gran importancia como productor industrial y como cepa modelo, *E. coli* es probablemente el organismo más estudiado de todos los microorganismos usados para aplicaciones biotecnológicas [7].

Las ventajas de usar *E. coli* como organismo hospedero son bien conocidas: alta tasa de crecimiento (su tiempo de duplicación es de

aproximadamente 20 min), posee altos niveles de expresión, es relativamente fácil de escalar y es económico [5, 8–10].

En *E. coli*, la producción de proteínas recombinantes es acumulada en el citoplasma o en el periplasma. Frecuentemente se usa el citoplasma como la primera elección para producción de proteínas heterólogas debido a sus grandes rendimientos [11], sin embargo el periplasma ofrece varias ventajas para la producción de proteínas terapéuticas, incluyendo la simplificación del proceso de purificación por la reducción en proteínas contaminantes y ácidos nucleicos, además, el espacio periplásmico es un compartimento oxidante, que es importante para la producción de proteínas que contengan enlaces disulfuro [12, 13].

Sin embargo como todos los sistemas de expresión posee ciertas desventajas, las dos principales son, la incapacidad de *E. coli* para realizar modificaciones post-traduccionales y la formación de cuerpos de inclusión [6, 14].

Altos niveles de expresión de la proteína, así como la falta de chaperones para ayudar en el correcto plegamiento son los que propician la formación de cuerpos de inclusión.

Para obtener una proteína funcional a partir de los cuerpos de inclusión estos necesitan solubilizarse. Esto se logra utilizando altas concentraciones de desnaturalizantes, tales como urea o hidrocloreuro de guanidina, posteriormente se debe replegar la proteína removiendo los desnaturalizantes, sin embargo el rendimiento global de la proteína obtenida oscila entre el 15-25% de la proteína

total, lo que explica el coste principal de la producción de proteína recombinante en *E. coli* [11, 15, 16].

En adición a lo antes mencionado la producción de péptidos en *E. coli* por expresión directa puede conducir a diversos problemas como degradación del producto, rendimientos de recuperación deficientes o generar toxicidad en el huésped. Para superar todos estos problemas, los sistemas de expresión a menudo producen péptidos recombinantes como péptidos fusionados, unidos a una proteína con propiedades específicas (proteínas de fusión) [17, 18].

1.3 Proteínas de fusión

Las proteínas de fusión son generadas por la unión de dos o más genes mediante ingeniería genética que originalmente codifican para proteínas distintas. El resultado es un polipéptido con propiedades funcionales de ambas proteínas [19].

El uso de este tipo de proteínas es vital al producir proteínas recombinantes ya que no solo aumenta su solubilidad, también aumentan los niveles de expresión de la proteína, favorecen el correcto plegamiento y facilitan la purificación [16, 20]. En este estudio se usaron 2 proteínas de fusión CusF3H+ y PelB-SmbP.

CusF es una proteína periplásmica que forma parte del complejo CusCBFA presente en *E. coli* que se encarga de regular las concentraciones de plata y cobre, CusF puede ser usada como proteína de fusión en la expresión de

proteínas recombinantes. El polipéptido maduro es pequeño (9.9 kDa) y posee una estructura de forma de barril con 5 plegamientos beta [21].

Las proteínas recombinantes marcadas con CusF se pueden purificar mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC), utilizando iones de Cu(II). Debido a que se quería optimizar el proceso de purificación se creó CusF3H⁺ que es una mutante de CusF a la cual se le han agregado 3 histidinas en el N-terminal para fomentar la afinidad a iones Ni(II), ya que con éstos se obtiene mayor pureza que utilizando Cu(II) [22].

La proteína pequeña de unión a metales (SmbP por sus siglas en inglés) es también una proteína de 9.9 kDa aislada del periplasma de *Nitrosomonas europaea*. La proteína madura es un monómero de sólo 93 aminoácidos que tiene la capacidad de unirse a diferentes iones metálicos divalentes como Cu, Ni y Zn; por lo tanto, se ha propuesto que es una proteína de eliminación de metales en *N. europaea* para hacer frente a las altas concentraciones de cobre [23].

1.4 Hormona del crecimiento humana

La hormona del crecimiento humana (hGH) es una proteína compuesta por 191 aminoácidos con un peso molecular de 22 kDa unida por dos puentes disulfuro (Fig1), la cual es producida, almacenada y secretada por la glándula pituitaria [24].

Es una de las hormonas más importantes en el cuerpo humano debido a su papel central en una variedad de funciones biológicas, incluyendo la proliferación celular, el metabolismo, el crecimiento y la inmunidad [25].

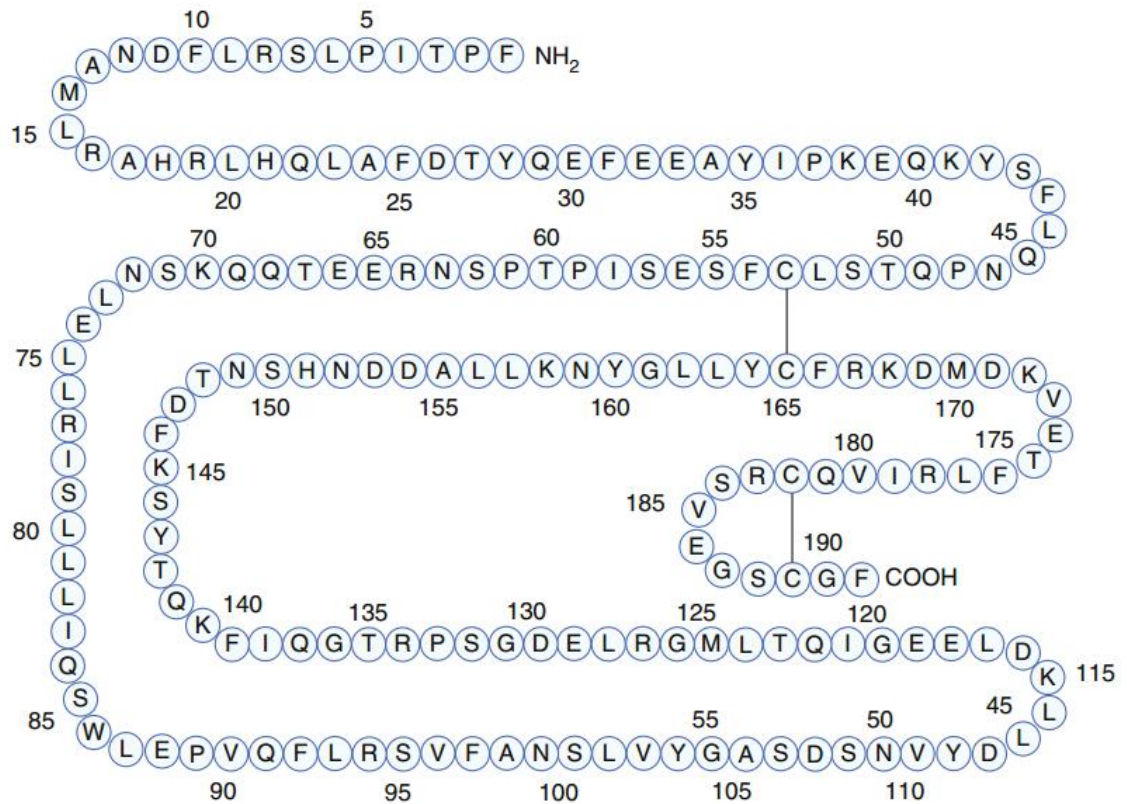


Figura 1. Estructura primaria de la hGH [1].

La hGH se usa principalmente para tratar deficiencia en la secreción de la misma en niños que nacieron pequeños para la edad gestacional, talla baja idiopática, el síndrome de Turner y el síndrome de Prader Willi. Antes del desarrollo de la hGH recombinante, ésta se obtenía de la glándula pituitaria de cadáveres.

Esta práctica derivó en el desarrollo en algunos pacientes de la enfermedad de Creutzfeld–Jacob un padecimiento poco común el cual causa degeneración en el sistema nervioso y es incurable [26]. Debido a esto y a la alta demanda de hGH surgió la necesidad de la obtención de la hormona en mayores cantidades y con mayor pureza.

CAPÍTULO 2

2. ANTECEDENTES

2.1 Las proteínas de fusión SmbP y CusF

A partir del aislamiento de SmbP de *Nitrosomonas europaea* y el análisis de sus características se decidió que pudiera ser un buen candidato para ser usado como proteína de fusión. Pero no fue hasta el 2015 que esta proteína periplásmica se utilizó como proteína de fusión.

Se usó SmbP para expresar la proteína rojo fluorescente (RFP), proteína verde fluorescente (GFP), proteína nucleótido difosfato quinasa (NDPK2), proteína regulador respuesta de LovK (LovR) y hipocótilo corto 2 (SHY2).

Para observar el desempeño como proteína de fusión de SmbP se compararon los niveles de expresión de esta contra las proteínas de fusión MBP y GST, en adición se llevó a cabo la expresión de GFP comparándolo con una etiqueta de histidina. Usando SmbP como proteína de fusión se obtuvieron 5.6 mg/L de GFP pura mientras que con la etiqueta de histidinas se obtuvo 3.5mg/L [21].

CusF presentaba un potencial parecido al de SmbP para ser usada como proteína de fusión por lo que en el 2015 se utilizó para expresar la proteína rojo fluorescente (RFP), proteína verde fluorescente (GFP), proteína regulador respuesta de LovK (LovR) y hipocótilo corto 2 (SHY2).

Para observar el desempeño como proteína de fusión de CusF se compararon los niveles de expresión de esta contra las proteínas de fusión MBP y GST, en adición se llevó acabo la expresión de GFP comparándolo con una etiqueta de histidina. Usando CusF como proteína de fusión se obtuvieron 6.0 mg/L de GFP pura mientras que con la etiqueta de histidinas se obtuvo 3.5mg/L [23].

2.2 Expresión de la hormona del crecimiento

La hormona del crecimiento humano recombinante fue expresada por primera vez en 1979 [27, 28] y fue aprobada para su uso clínico en 1985 para el tratamiento de niños con baja estatura [29].

Una variedad de organismos se han usado para su expresión tales es el caso de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* entre otros [30].

Ya que la hGH es una proteína no glicosilada se ha producido extensamente en sistemas de expresión procariota [31].

En 1986 Hsiung, utilizó el péptido señal de la proteína de membrana externa A (OmpA), para expresar la hGH en el periplasma de *E. coli* y tratar de evitar la formación de cuerpos de inclusión, si bien la cantidad de proteína producida no fue muy alta, logro una pureza mayor a 90% el emplear

cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño [32].

Uno de los primeros acercamientos al uso de etiquetas se llevó a cabo en 1995 por Mukhija y colaboradores usando His₆-tag en el N-terminal con un promotor T5 para lograr altos niveles de producción. La proteína como era de esperarse fue expresada como cuerpos de inclusión en el citoplasma de *E. coli*, pues ya que no contaba con ningún péptido señal que dirigiera la síntesis hacia el periplasma. Ya que la proteína obtenida era insoluble se usó hidrocloreto de la guanidina 6M para solubilizar los cuerpos de inclusión y así poder purificar la proteína mediante cromatografía de afinidad obteniendo 30 mg por litro de cultivo de hGH activa [33].

En 2007, Koo y colaboradores disminuyeron la velocidad de la expresión con el motivo de disminuir la formación de cuerpos de inclusión. La expresión se llevó a cabo en la cepa BL21(D3) usando el promotor T7 y se variaron las concentraciones de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Con estas modificaciones se lograron obtener un 93% de proteína soluble [34].

En 2012 Sockolosky y colaboradores usaron los péptidos señal pelB y OmpA para así poder expresar la proteína en el espacio periplásmico de *E. coli* y evitar la formación de cuerpos de inclusión. Se obtuvieron 2.57 mg/L usando pelB y 2.29 mg/L con OmpA de hGH activa y correctamente plegada [35].

En el 2013 Kim y colaboradores centrándose en la purificación usaron diversos métodos cromatográficos como cromatografía de intercambio aniónico,

cromatografía por exclusión y cromatografía de afinidad para mejorar la pureza de la hGH. Posteriormente variaron las condiciones de extracción probando con diversos buffers al momento de la extracción. Con estas modificaciones se obtuvo un grado de pureza de His-hGH y hGH sin marcar de 97.6% y 98.7% respectivamente [31].

En el 2014, Nguyen y colaboradores probaron siete proteínas de fusión distintas: hexahistidine (His6), thioredoxin (Trx), glutathione S-transferase (GST), maltose-binding protein (MBP), N-utilization substance protein A (NusA), protein disulfide bond isomerase (PDI), y el b'a' dominio de PDI (PDlb'a'). Inicialmente la temperatura de expresión fue 37 °C. Posteriormente se utilizó una de 18° C ya que se observó que con esta temperatura había un incremento drástico en la solubilidad de la proteína. Para la purificación se utilizó tanto cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) como cromatografía de filtración en gel. Usando el promotor T7 y IPTG como inductor en las expresiones se obtuvieron en promedio 37 mg, 12 mg, y 7 mg de hGH de 500 ml de cultivo usando TrxhGH, MBP-hGH, and PDlb'a'-hGH respectivamente [15].

CAPÍTULO 3

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Las proteínas de fusión CusF3H⁺ y SmbP permitirán producir hGH recombinante en el periplasma de *E. coli*.

3.2 Objetivo general

Producir hGH recombinante en *E. coli* utilizando CusF3H⁺ y SmbP como proteínas de fusión.

3.3 Objetivos específicos

- 1.- Construir plásmidos para la expresión de hGH recombinante marcada con CusF3H⁺ y SmbP.
- 2.- Expresión de la hGH en *E. coli* BL21(DE3).
- 3.- Extracción de la hGH del periplasma de *E. coli*.
- 4.- Purificar hGH recombinante por medio de cromatografía de afinidad utilizando iones metálicos Ni(II).

CAPÍTULO 4

4. METODOLOGÍA DE TRABAJO

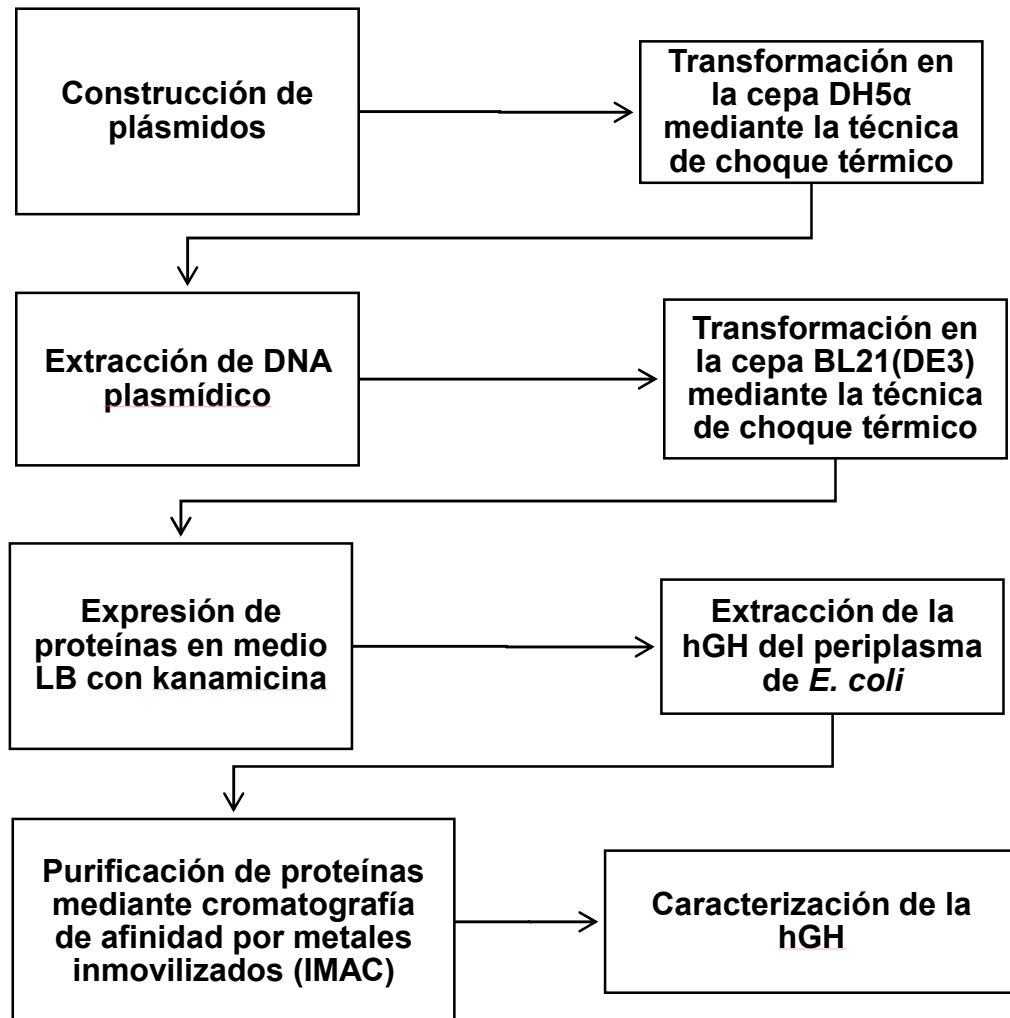


Figura 2. Estrategia general trabajo.

4.1 Obtención de gen de la hGH

4.1.1 Resuspensión de la cadena nucleotídica que codifica para la hormona del crecimiento humano.

A la secuencia que codifica para la hormona del crecimiento se le agregaron los sitios de corte pertenecientes a las endonucleasas NcoI y XhoI para poder insertarla con facilidad en el plásmido pET30a.

Estas secuencias fueron enviadas a sintetizarse a GenScript, Corporation con los codones optimizados para su expresión en *E. coli*.

La cadena nucleotídica liofilizada venía contenida en el plásmido pUC57 el cual es resistente a ampicilina. El liofilizado se resuspendió en 100 µL de agua mQ para obtener una concentración final de 40 ng/ml.

4.1.2 Transformación del plásmido pUC57-hGH

Se emplearon 10 ng/ml del plásmido pUC57-hGH y se mezcló con 30 µL de células de *E. coli* DH5α rubidio-competentes en un microtubo de 1.5 mL en hielo donde se incubó por 25 a 30 minutos. Posteriormente se realizó un choque térmico de 45 segundos a 44 °C, al terminar se colocó nuevamente en hielo, pasados dos minutos se agregaron 800 µL de caldo LB.

Una vez agregado el caldo LB, se mezcló suavemente y se incubó 1 h a 37 °C en agitación a 200 rpm. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a 13000 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente de 50 a 100 µL de caldo LB. Se resuspendieron las células en dicho volumen y se transfirieron a placas de agar LB con ampicilina a una

concentración final de 100 µg/mL y se esparció por la placa por extensión con varilla. Se incubaron las placas durante 16 horas a 37 °C.

4.1.3 Extracción del ADN plasmídico de pUC57-hGH

Se seleccionaron algunas de las colonias obtenidas en las placas. Estas, se inocularon en 6 mL de caldo LB suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL y se incubaron a 37 °C durante 16 horas en agitación a 200 rpm. Mediante centrifugación a 10000 rpm por 2 minutos se recolectó el sedimento celular de los 6 mL del cultivo, una vez obtenido se extrajo el ADN plasmídico empleando el kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

4.1.4 Digestión del plásmido pUC57-hGH

Se digirieron 1500 ng del plásmido pUC57-hGH. El volumen final de la digestión fue de 50 µL, la cual estaba compuesta por 3.5 µL de ADN plasmídico, 5 µL de solución amortiguadora 3.1 10x, 15 U de XhoI y 15 U de NcoI y completando a 50 µL con agua mQ. La reacción se dejó incubando 16 horas a 37 °C, posteriormente se realizó un gel de agarosa al 0.7% usando TAE como solución amortiguadora y se purificó empleando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.2 Amplificación del ADN de PelB-SmbP y CusF3H+

La amplificación del ADN de PelB-SmbP así como el de CusF3H+ se llevó a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL en microtubos para PCR de 200 µL.

Las reacciones contenían los siguientes reactivos: 1 µL (aproximadamente 10 ng) de ADN de los insertos (PelB-SmbP y CusF3H+), 5 µL de solución amortiguadora de reacción, 3 µL de iniciador delantero (60 pmoles), 3 µL de iniciador reverso (60 pmoles), 1 µL (10nM) de dNTPs, 1 U de Vent polimerasa y se completó la reacción con 36.5 µL de agua mQ.

La amplificación se realizó en un termociclador marca Techme (modelo ³Prime) con las siguientes condiciones:

La desnaturalización inicial fue de 2 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización por 1 minuto a 95 °C, alineamiento por 30 segundos a 58 °C y elongación por 45 segundos a 72 °C y por ultimo una extensión final por 10 minutos a 72 °C.

Para la amplificación de los insertos se usaron los siguientes iniciadores:

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la amplificación de PelB-SmbP y CusF3H+

Iniciador	Secuencia de aminoácidos
PelB-SmbP iniciador delantero	5'-ATGCATGCACATATGAAATACCTGCTGCCG-3'
PelB-SmbP iniciador reverso	5'-ATGCATGGATCCGTGCGATTTATGTTCCGGATGC-3'
CusF3H+ iniciador delantero	5'-ATGCAGTCACATATGAAAAAAGCACTGCAAGTCG-3'
CusF3H+ iniciador reverso	5'-ATGCATGCAGGTACCCTGGCTGACTTTAATATCCTGTAA-3'

Los iniciadores delanteros se diseñaron conteniendo el sitio de corte para la enzima de restricción NdeI, mientras que los iniciadores reversos contenían el sitio de corte de la enzima KpnI.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para confirmar que la amplificación se haya realizado de forma correcta.

4.3 Construcción de los plásmidos pET30a-PelB-SmbP y pET30a-CusF3H+

4.3.1 Digestión del plásmido pET30a

Se digirieron 1,500 ng del plásmido pET30a. El volumen final de la digestión fue de 20 μ L, la cual estaba compuesta por 10 μ L de ADN plasmídico, 2 μ L de solución amortiguadora 3.1 10x (NEB), 15 U de NdeI y 10 U de KpnI y completando a 5.5 μ L con agua mQ. La reacción se dejó incubando 2 h a 37 °C y por último se agregó 1 U de SAP dejando incubar por 1 h más a 37 °C. Las digestiones se llevaron a cabo en una incubadora marca LabTech (modelo LSI-3016A). Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.3.2 Digestión de los insertos PelB-SmbP y CusF3H+

Se digirieron 1,500 ng de los insertos PelB-SmbP y CusF3H+. El volumen final de las digestiones fue de 50 μ L, la cual estaba compuesta por 23 μ L de ADN plasmídico, 5 μ L de solución amortiguadora 3.1 10x , 10 U de NdeI y 10 U de KpnI y completando a 20 μ L con agua mQ. La reacción se dejó incubando 1 h a 37 °C. Las digestiones se llevaron a cabo en una incubadora marca LabTech (modelo LSI-3016A). Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.3.3 Ligación del plásmido pET30a con los insertos PelB-SmbP y CusF3H+

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo simultáneamente en un volumen final de 20 μ L y consistió en los siguientes reactivos: 3 μ L de pET30a previamente digerido (10.6ng/ml), 1 μ L de inserto tanto de PelB-SmbP (64.7 ng/ml) como de CusF3H+ (60.1 ng/ml), 2 μ L de solución amortiguadora de ligasa

10x (BioBasic), 0.5 U de T4 DNA ligasa y completando las reacciones a 13.5 μ L con agua mQ.

Como control negativo se llevó a cabo una reacción sin inserto conteniendo los mismos reactivos de la reacción antes mencionada y se completó el volumen final con 14.5 μ L de agua mQ. La reacción se incubó a 4 °C toda la noche. Finalmente, la T4 DNA ligasa se inactivó a 65 °C durante 10 minutos en baño maría.

4.3.4 Transformación de los plásmidos pET30a-PelB-SmbP y pET30a-CusF3H+

La transformación con los dos plásmidos se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 4.1.2 usando kanamicina a una concentración final de 30 μ g/mL.

4.3.5 Extracción de ADN plasmídico

El procedimiento para la extracción de los dos plásmidos se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 4.1.3.

4.3.5 Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas

Se realizó una amplificación por PCR utilizando los iniciadores delantero y reverso T7 para confirmar que las construcciones pET30a-PelB-SmbP y pET30a-CusF3H+ se hallan realizado de forma correcta. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ L conteniendo los siguientes reactivos: 1 μ L (aproximadamente 10 ng) de ADN plasmídico, 5 μ L de solución amortiguadora Taq 10x (GenScript Corporation), 3 μ L de iniciador delantero (60 pmoles), 3 μ L de iniciador reverso (60 pmoles), 1 μ L (10nM) de dNTPs, 2.5 U de Taq polimerasa (GenScript Corporation) y se completó con 36.5 μ L de agua mQ.

Como control negativo se llevó a cabo una reacción sin ADN plasmídico conteniendo los mismos reactivos de la reacción antes mencionada y se completó el volumen final con agua mQ.

La amplificación se realizó en un termociclador marca Techme (modelo ³Prime) con las siguientes condiciones:

La desnaturalización inicial fue de 2 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización por 1 minuto a 95 °C, alineamiento por 1 minuto a 55 °C y elongación por 45 segundos a 72 °C y por ultimo una extensión final por 10 minutos a 72 °C.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones.

4.4 Construcción de los plásmidos pET30a-PelB-SmbP-hGH y pET30a-CusF3H+-hGH

4.4.1 Digestión de las construcciones pET30a-PelB-SmbP y pET30a-CusF3H+

Se digirieron 1,500 ng de las dos construcciones. El volumen final de las digestiones fue de 20 µL, la cual estaba compuesta por 9 µL de ADN plasmídico, 2 µL de solución amortiguadora 3.1 10x, 10 U de XhoI y 6 µL de agua mQ, la reacción se dejó incubando 1.5 horas a 37 °C, posteriormente se agregó 10 U de NcoI y se dejó incubando 1.5 horas a 37 °C y para finalizar se agregó 1 U de SAP dejando incubar por 1 hora más a 37 °C.

Las digestiones se llevaron a cabo en una incubadora marca LabTech (modelo LSI-3016A). Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.4.2 Ligación de las construcciones pET30a-PelB-SmbP y pET30a-CusF3H+ con el inserto hGH

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo simultáneamente en un volumen final de 10 μ L.

La ligación de la construcción pET30a-PelB-SmbP consistió en los siguientes reactivos: 3 μ L del ADN plasmídico previamente digerido (22 ng/ml), 5.5 μ L de inserto (18.4 ng/ml), 1 μ L de solución amortiguadora de ligasa 10x (BioBasic), 0.5 U de T4 DNA ligasa.

Como control negativo se llevó a cabo una reacción sin inserto conteniendo los mismos reactivos de la reacción antes mencionada y se completó el volumen final con 5.5 μ L de agua mQ. La reacción se incubó a 4 °C toda la noche. Finalmente, la T4 DNA ligasa se inactivó a 65 °C durante 10 minutos en baño maría.

Para la reacción de ligación de la construcción pET30a-CusF3H+ estos fueron los reactivos utilizados: 3 μ L del ADN plasmídico previamente digerido (14.1 ng/ml), 5.5 μ L de inserto (18.4 ng/ml), 1 μ L de solución amortiguadora de ligasa 10x (BioBasic), 0.5 U de T4 DNA ligasa.

Como control negativo se llevó a cabo una reacción con 0 μ L de inserto conteniendo los mismos reactivos de la reacción antes mencionada y se completó el volumen final con 5.5 μ L de agua mQ. La reacción se incubó a 4 °C toda la noche. Finalmente, la T4 DNA ligasa se inactivó a 65 °C durante 10 minutos en baño maría.

4.4.3 Transformación de los plásmidos pET30a-PelB-SmbP-hGH y pET30a-CusF3H+-hGH

La transformación con los dos plásmidos se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 4.1.2 usando kanamicina a una concentración final de 30 µg/mL.

4.4.4 Extracción de ADN plasmídico

El procedimiento para la extracción de los dos plásmidos se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 4.1.3.

4.4.5 Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas

Se realizó una amplificación por PCR utilizando los iniciadores delantero y reverso T7 para confirmar que las construcciones pET30a-PelB-SmbP-hGH y pET30a-CusF3H+-hGH se hallan realizado de forma correcta. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL conteniendo los siguientes reactivos: 1 µL (aproximadamente 10 ng) de ADN plasmídico, 5 µL de solución amortiguadora Taq 10x (GenScript Corporation), 3 µL de iniciador delantero (60 pmoles), 3 µL de iniciador reverso (60 pmoles), 1 µL (10nM) de dNTPs, 2.5 U de Taq polimerasa (GenScript Corporation) y se completó con 36.5 µL de agua mQ.

Como control negativo se llevó a cabo una reacción con sin ADN plasmídico conteniendo los mismos reactivos de la reacción antes mencionada y se completó el volumen final con agua mQ.

La amplificación se realizó en un termociclador marca Techme (modelo ³Prime) con las siguientes condiciones:

La desnaturalización inicial fue de 2 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización por 1 minuto a 95 °C, alineamiento por 1 minuto a 55 °C y elongación por 1 minuto y 20 segundos a 72 °C y por ultimo una extensión final por 2 minutos a 72 °C.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones.

4.5 Expresión de la hGH en *E. coli* BL21(DE3)

4.5.1 Transformación de *E. coli* BL21(DE3) con las construcciones pET30a-PelB-SmbP-hGH y pET30a-CusF3H+-hGH BL21(DE3)

La transformación de las dos construcciones se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* BL21(DE3). Se empleó 10 ng del ADN plasmídico en 20 µL de células de *E. coli* BL21(DE3) rubidio-competentes en un microtubo eppendorf de 1.5 ml en hielo donde se incubó por 25 a 30 minutos. Posteriormente se realizó un choque térmico de 45 segundos a 44 °C, al terminar se colocó nuevamente en hielo, pasados dos minutos se agregaron 800 µL de caldo LB.

Una vez agregado el caldo LB, se mezcló suavemente y se incubó 1 h a 37 °C en agitación a 200 rpm. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a 13000 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente de 50 a 100 µL de caldo LB. Se resuspendieron las células en dicho volumen y se transfirieron a placas de agar LB con Kanamicina a una concentración final de 30 µg/mL y se esparció por la placa por extensión con varilla. Se incubaron las placas durante 16 horas a 37 °C.

4.5.2. Expresión piloto de proteínas

Se realizó una expresión piloto para observar si las *E. coli* BL21(DE3) transformadas era capaces de producir hGH.

Se seleccionaron 2 colonias por construcción las placas, con la ayuda de un aplicador se transfirieron a un tubo que contenía 2 mL de caldo LB suplementado con Kanamicina a una concentración final de 30 µg/mL y se incubaron a 37 °C durante 16 horas en agitación a 200 rpm. Después de las 16 horas se tomaron 20 µL del cultivo y se inocularon en un matraz de 250 ml conteniendo 20 ml de caldo LB con Kanamicina a una concentración final de 30 µg/mL).

Estos matraces se incubaron a 37 °C con 200 rpm de agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 0.4 – 0.6.

Una vez alcanzado el D.O.₆₀₀ se detuvo la incubación y se atemperaron los cultivos, posteriormente se llevó a cabo la inducción utilizando IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Los cultivos se llevaron a incubación de 25°C a 200 rpm de agitación por 16 horas, se recolectaron los sedimentos celulares centrifugando a 10,000 rpm durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante.

4.5.3. Lisis celular

Para obtener la proteína presente dentro de la bacteria se realiza una lisis celular. Primero se obtuvo la proteína soluble presente en la bacteria esto se logró resuspendiendo el sedimento celular con 120 µL de agua mQ, una vez resuspendido se le agregaron 40 µL de solución amortiguadora de carga para

SDS-PAGE 6x y se mezcló suavemente, se hirvió durante 10 minutos y se centrifugo a 13000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación es la fracción soluble. Al sedimento restante se le agregaron 120 µL de solución de urea 8 M y se hierve nuevamente durante 10 minutos este proceso se realiza para solubilizar los cuerpos de inclusión que pudieron haberse formado, finalmente se centrifuga a 13,000 rpm por 10 minutos obteniendo así la fracción insoluble en el sobrenadante.

4.5.4. Análisis de las fracciones soluble e insoluble por SDS-PAGE

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un gel de resolución al 12%, un gel apilador al 4% y TGS como solución amortiguadora.

Una vez terminada la electroforesis se realizó la tinción con azul de Coomassie para observar las bandas correspondientes de las proteínas.

4.5.5. Segunda expresión piloto de proteínas

Se realizó una segunda expresión piloto ya que ahora no se lisó la bacteria si no que se realizaría un choque osmótico para extraer solamente las proteínas presentes en el periplasma de *E. coli*.

Se realizó la expresión piloto conforme a lo descrito en la sección 4.5.2.

4.5.6 Extracción de proteínas periplásmicas por el método de lisozima/choque osmótico

Para la extracción de proteínas periplásmicas se siguió el método lisozima/choque osmótico con modificaciones. Se obtuvo el peso del sedimento obtenido en la segunda expresión de proteínas, en base a este peso se

resuspendió el sedimento celular en solución hipertónica (20% de sacarosa, 200 mM de Tris-HCl, 2 mM EDTA y 0.5mg/ml de lisozima) a razón de 1ml de solución hipertónica por cada 0.05 g de sedimento. Una vez resuspendido se incubó a 4 °C durante 1 hora, se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos, se recolectó el sobrenadante y se guardó como fracción hipertónica. Al paquete celular restante se le agregó agua mQ a razón de 1ml de agua mQ por cada 0.05 g y se resuspendió. Una vez resuspendido se incubó a 4 °C durante 1 hora, se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos, se recolectó el sobrenadante y se guardó como fracción hipotónica.

Una vez obtenidas las dos fracciones se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un gel de resolución al 12%, un gel apilador al 4% y TGS como solución amortiguadora.

Una vez terminada la electroforesis se realizó la tinción con azul de Coomassie para observar las bandas correspondientes de las proteínas.

4.5.7 Escalamiento usando 1 L de medio de cultivo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las expresiones piloto se seleccionaron las colonias que presentaron la mayor producción de proteína, una por cada construcción, con la ayuda de un aplicador se transfirieron a un tubo que contenía 2 mL de caldo LB suplementado con kanamicina a una concentración final de 30 µg/mL y se incubaron a 37 °C durante 16 horas en agitación a 200 rpm.

Después de las 16 horas se tomaron 125 µL del cultivo y se inocularon en 8 matraces de 500 ml cada uno conteniendo 125 ml de medio LB suplementado con kanamicina a una concentración final de 30 µg/mL obteniendo un volumen final de 1 L.

Los matraces se incubaron a 37 °C con 200 rpm de agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 0.4 – 0.6. Una vez alcanzado el D.O.₆₀₀ se detuvo la incubación y se atemperaron los cultivos, posteriormente se llevó a cabo la inducción utilizando IPTG a una concentración final de 0.1 mM.

Una vez inducidos, los cultivos se incubaron a 25°C por 16 horas a 200 rpm de agitación, pasadas las 16 horas de incubación se recolectaron los sedimentos celulares centrifugando a 10,000 rpm durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante.

4.5.8 Extracción de proteínas periplásmicas por el método de lisozima/choque osmótico

Para la extracción de proteínas periplásmicas se siguió el método lisozima/choque osmótico con modificaciones descrito en la sección 4.5.6, una vez obtenidas las dos fracciones se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un gel de resolución al 12%, un gel apilador al 4% y TGS como solución amortiguadora.

Una vez terminada la electroforesis se realizó la tinción con azul de Coomassie para observar las bandas correspondientes de las proteínas.

4.6 Purificación de la hGH

4.6.1 Diálisis de la fracciones obtenidas

Las dos fracciones obtenidas en la extracción por el método de lisozima/choque osmótico se mezclan y se les realiza una diálisis para que la proteína se encuentre en condiciones ideales para la purificación.

La mezcla de las dos fracciones se vierten dentro de una membrana de diálisis SnakeSkin Pleated (10K MWCO) y se puso en contacto con una solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0 y con agitación. Se realizaron dos diálisis de una hora cada una y una más de 16 horas.

4.6.2 Tipos de técnicas empleadas para la purificación de la hGH

A continuación se describirán los tres tipos de técnicas que se usaron para la purificación de la hGH.

4.6.2.1 Cromatografía IMAC empleando la resina Profinity™ de Bio-Rad

Se tomaron 1.0 ml de la resina Profinity™ de Bio-Rad y se depositaron en un microtubo de 2 mL, la resina se centrifugó para retirar el líquido de almacenamiento y se lavó con 5 volúmenes de columna de agua mQ, se equilibró con 5 volúmenes de una solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0 y se cargó la resina con 5 volúmenes de una solución de NiSO₄ al 0.1 M.

Una vez cargada la columna se lavó con 5 volúmenes de una solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0 y después con 10 volúmenes de agua mQ. Se volvió a equilibrar la columna con 5 volúmenes de una solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 500

mM NaCl pH 8.0 y se puso en contacto con la muestra obtenida de la diálisis por una hora.

Pasada la hora en contacto con la resina se lavó nuevamente con 5 volúmenes de una solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0 colectándose los lavados. Se eluyó la proteína usando 5 volúmenes de una solución amortiguadora que contenía 200 mM de imidazol, 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0, se colectaron las fracciones y por último se lavó la resina con 10 volúmenes de agua mQ y se dejó almacenada en etanol al 70%.

Todas las centrifugaciones que se llevaron a cabo en esta técnica fueron a 13,000 rpm.

Para visualizar las fracciones obtenidas se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un gel de resolución al 12%, un gel apilador al 4% y TGS como solución amortiguadora.

Una vez terminada la electroforesis se realizó la tinción con azul de Coomassie para observar las bandas correspondientes de las proteínas.

4.6.2.2 Cromatografía IMAC empleando el sistema cromatográfico ÄKTA prime plus

Se utilizó una columna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare) la cual fue cargada con 3 volúmenes de columna de NiSO₄ al 0.1 M. La columna se equilibró con 5 volúmenes de solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0 utilizando un flujo de 1.0 ml/min y una presión máxima de 0.5 MPa.

La muestra obtenida de la diálisis se hizo pasar a través de la columna utilizando un flujo de 1.0 ml/min y una presión máxima de 0.5 MPa, recolectando la fase no unida.

Después que paso toda la muestra por la columna se lavó con 5 volúmenes de solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0 hasta que la señal U.V. descendiera y se mantuviera constante.

Finalmente se llevó a cabo la elución utilizando un gradiente de concentración de 0 a 100% de una solución amortiguadora que contenía 200 mM imidazole 50 mM, Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0 usando un flujo de 1.0 mL/min y una presión máxima de 0.5 MPa recolectando fracciones de 0.5 mL.

Para visualizar las fracciones obtenidas se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un gel de resolución al 12%, un gel apilador al 4% y TGS como solución amortiguadora.

Una vez terminada la electroforesis se realizó la tinción con azul de Coomassie para observar las bandas correspondientes de las proteínas.

4.6.2.3 Cromatografía de intercambio aniónico empleando el sistema cromatográfico ÄKTA prime plus

Para poder realizar esta técnica se requiere que la mezcla de las fracciones obtenidas en la extracción por el método de lisozima/choque sean dializadas usando una solución amortiguadora que contenga 50 mM Tris-HCl.

La técnica se lleva a cabo de acuerdo a lo descrito en la sección 4.6.2.2 reemplazando las soluciones de lavado y equilibrio con una solución

amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y la solución de elución con una solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 1 M NaCl pH 8.0.

4.6.3. Diálisis para la remoción de imidazol

De las fracciones obtenidas usando IMAC, se seleccionaron las que se observó que tenían mayor cantidad de proteína según lo indicado por la electroforesis en gel de poliacrilamida, a estas fracciones se les realizó una diálisis llevando a cabo la técnica según lo descrito en la sección 4.6.1.

4.7 Cuantificación de proteínas por el método Bradford

Para la cuantificación de proteínas se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones del estándar de BSA (1 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.2 mg/mL y 0.1 mg/mL). En una placa de 96 pocillos se adicionaron 5 μ L, tanto del estándar como de las muestras a analizar, en diferentes pocillos. Posteriormente se adicionaron 200 μ L del reactivo de Bradford dejando incubar durante 5 minutos con agitación en un lector de microplacas marca Thermo Scientific (Modelo MultiSkan GO) para finalmente realizar la medición de la absorbancia a 595 nm en el mismo lector. Las pruebas se realizaron por triplicado. Si alguna muestra se encontró fuera de la curva se le realizaron las diluciones pertinentes.

4.8 Corte de la proteína de fusión

La remoción de la proteína de fusión se realizó utilizando la enzima enteroquinasa de cadena ligera (NEB). Según los resultados del método Bradford se tomó 1 mg de proteína a la cual se le adicionaron 3.2 μ L de la enzima la cual

se encontraba a una concentración de 2 µg/mL para posteriormente dejarse incubando por 20 horas a 25 °C.

4.9 Segunda cromatografía de afinidad

Con el fin de remover la proteína de fusión cortada en el paso anterior y eliminar cualquier impureza restante se realizó una segunda cromatografía de afinidad siguiendo el método descrito en la sección 4.6.2.1, una vez terminada la purificación se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un gel de resolución al 12%, un gel apilador al 4% y TGS como solución amortiguadora.

Una vez terminada la electroforesis se realizó la tinción con azul de Coomassie para observar las bandas correspondientes de las proteínas. La proteína obtenida restante se congeló a -20 °C.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS

5.1 Secuencia de la hGH optimizada para su expresión en *E. coli*

La secuencia que codifica para la hGH se envió a sintetizar GenScript, Corporation con los sitios de corte para las enzimas de restricción NcoI y XhoI.

CCATGGCT (NcoI)
TTTCCGACCATTCGCTGTCTCGTCTGTTTCGATAACGCGATGCTGCGT
GCACATCGTCTGCACCAGCTGGCGTTTGACACCTATCAAGAATTCGAA
GAAGCCTACATTCCGAAAGAACAGAAATATAGCTTTCTGCAGAATCCGC
AAACGTCTCTGTGCTTCAGCGAATCTATCCCGACCCCGAGTAACCGTG
AAGAAACGCAGCAGAAAAGCAATCTGGAAGTCTGCGCATTAGTCTGC
TGCTGATCCAGTCCTGGCTGGAACCGGTCCAATTTCTGCGTAGCGTGT
TCGCAAACCTCTCTGGTTTACGGTGCTAGTGATTCCAATGTCTATGATCT
GCTGAAAGACCTGGAAGAAGGCATTCAGACCCTGATGGGCCGTCTGG
AAGATGGTAGCCCGCGCACGGGCCAGATCTTTAAACAAACCTACTCAA
AATTCGACACGAACTCGCATAATGATGACGCGCTGCTGAAAACTATGG
TCTGCTGTACTGTTTTTCGCAAAGATATGGACAAAGTGGAACCTTCCTG
CGTATCGTGCAGTGCCGCTCAGTTGAAGGCTCGTGTGGTTTT
TAACTCGAG (XhoI)

Figura 3. Secuencia de la hGH optimizada para su expresión en *E. coli*.

5.2 Digestión del plásmido pUC57-hGH

En la Figura 4 se muestra la electroforesis realizada después de la digestión con las enzimas NcoI y XhoI. En el carril 1 podemos observar el marcador de peso molecular, en el carril 2 se pueden apreciar dos bandas, la primera de aproximadamente 2700 pb perteneciente al plásmido pUC57 mientras que la otra con 590 pb es la correspondiente a la hGH.

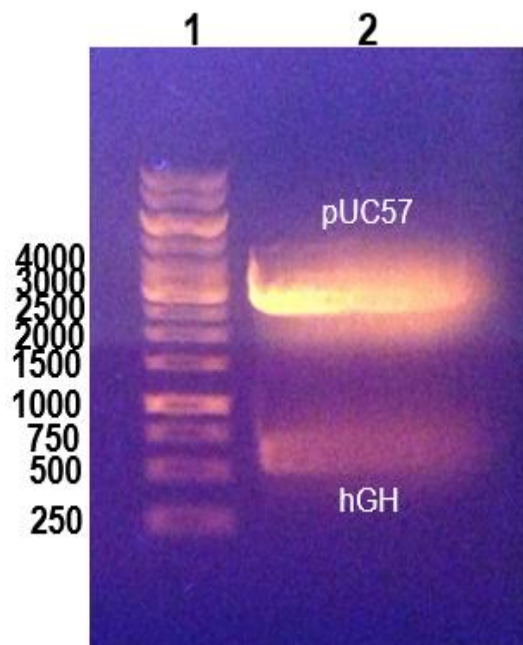


Figura 4. Gel de agarosa al 0.7% de la digestión de pUC57-hGH. Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder, Carril 2: Digestión plásmido pUC57 (2700 pb).

5.3 Amplificación del ADN de PelB-SmbP y CusF3H+

Se llevó a cabo la amplificación de las secuencias que codifican para CusF3H+ y PelB-SmbP (ver Tabla 2). Al finalizar la amplificación se llevaron a cabo electroforesis en gel de agarosa al 0.7%.

Tabla 2. Secuencia de aminoácidos de CusF3H+ y PelB-SmbP.

Inserto	Secuencia de aminoácidos
CusF3H+	MKKALQVAMFSLFTVIGFNAQ ANEHHHHHHHETMSEAQPQVI SATGVVKGVDLESKKITIHDPAAVNWPMTMRFTITPQTKM SEIKTGDKVAFNFVQQGNLSLLQDIKVSQ
PelB-SmbP	MKYLLPTAAAGLLLLAAQP AMASGHTAHVDEAVKHAEAAVA HGKEGHTDQLLEHAKESLTHAKAASEAGGNTHVGHGKIHLED AIKHGEEG HVGVATKHAQEAIEHLRASEHKSH

En la Figura 5 se puede ver en el carril 1 el marcador de peso molecular, en el 2 y 3 se puede apreciar una banda alrededor de 300, estas bandas están dentro del peso esperado al amplificar PelB-SmbP (354 pb).

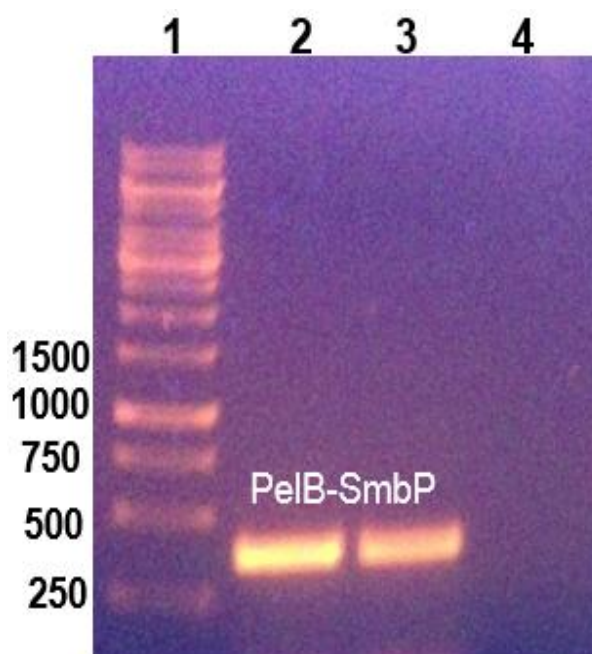


Figura 5. Gel de agarosa al 0.7%. de la Amplificación de PelB-SmbP. Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder, Carril 2,3: PelB-SmbP (354 pb), Carril 4: Control Negativo.

En la Figura 6 en el carril 1 se observa el marcador de peso molecular, en el 2 y 3 se puede apreciar una banda alrededor de 300 pb, estas bandas están dentro del peso esperado al amplificar CusF3H+ (348 pb).

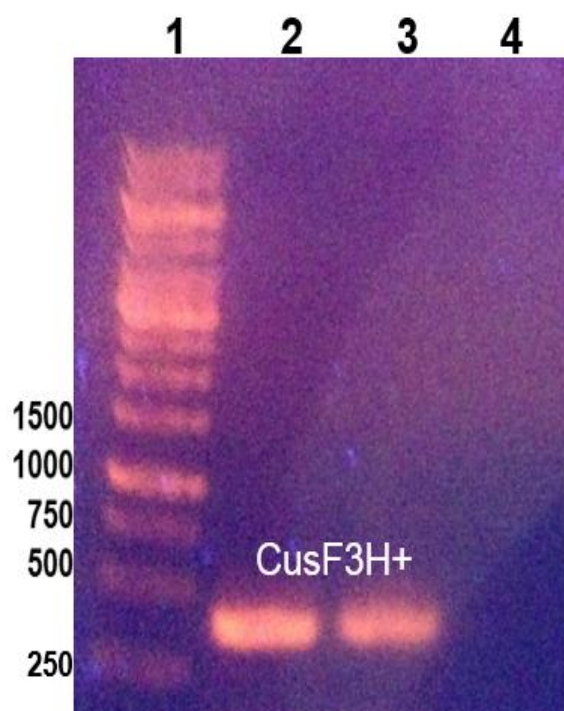


Figura 6. Gel de agarosa al 0.7% de la Amplificación de CusF3H+. Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder, Carril 2,3: CusF3H+ (348 pb), Carril 4: Control Negativo.

5.4 Construcción de los plásmidos pET30a-PelB-SmbP-hGH y pET30a-CusF3H+-hGH

Se realizó una amplificación por PCR utilizando los iniciadores delantero y reverso T7 para confirmar las dos construcciones.

A continuación se muestra la amplificación de pET30a-PelB-SmbP-hGH, en el carril 2 se puede observar una banda alrededor de los 1,200 pb, esto concuerda con el peso esperado de la construcción (1,176 pb), para realizar una comparación en el carril 3 se usó como control la construcción sin el gen de interés obteniendo una banda alrededor de las 600 pb, lo cual concuerda con el peso esperado para esta construcción (586 pb).

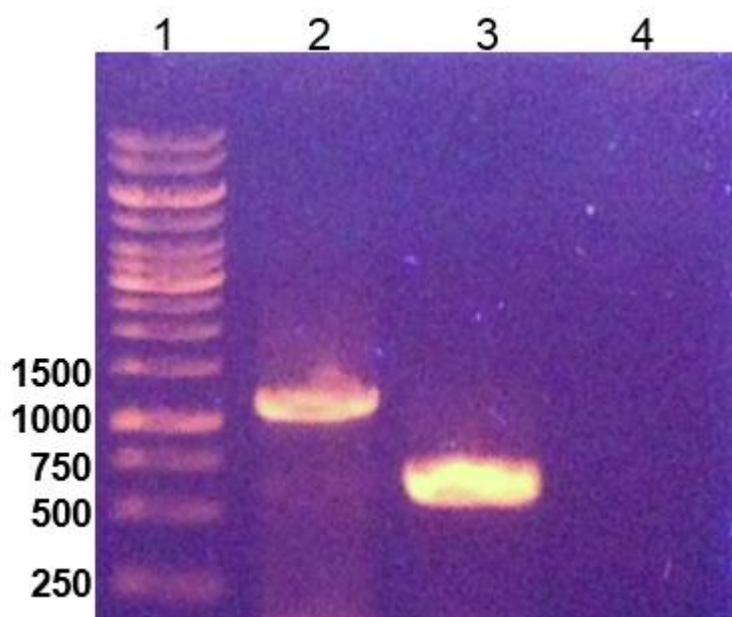


Figura 7. Gel de agarosa al 0.7% de la amplificación de pET30a-PelB-SmbP-hGH. Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder, Carril 2: Construcción PelB-SmbP-hGH (1,176 pb), Carril 3: Construcción sin hGH (586 pb) y Carril 4: Control Negativo.

En el siguiente gel de agarosa (ver Figura 8) se muestra la amplificación de CusF3H+-hGH, en el carril 3 se puede observar una banda alrededor de los 1,200 pb, esto concuerda con el peso esperado de la construcción (1,170 pb), para realizar una comparación en el carril 4 se usó como control la construcción sin el gen de interés obteniendo una banda alrededor de las 600 pb, lo cual concuerda con el peso esperado para esta construcción (580 pb).

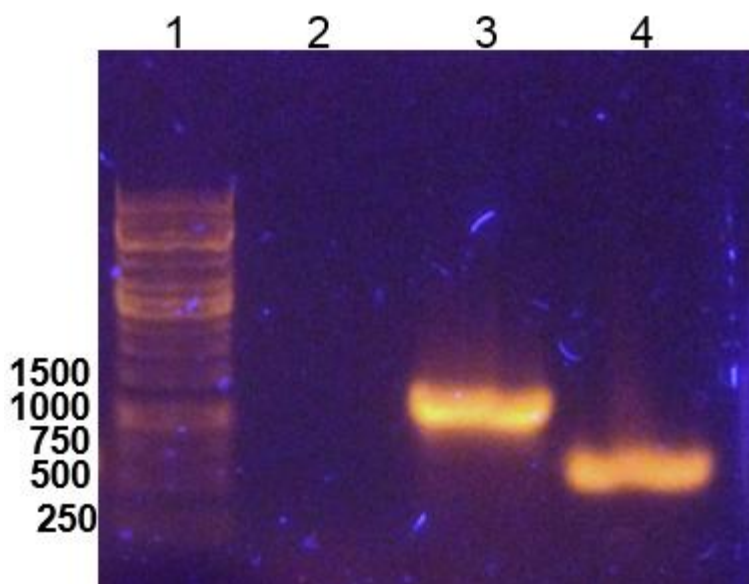


Figura 8. Gel de agarosa al 0.7% de la amplificación de CusF3H+-hGH. Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA ladder, Carril 2: Control Negativo, Carril 3: Construcción CusF3H+-hGH (1,170 pb) y Carril 4: Construcción sin hGH (580 pb)

5.5 Secuenciación de las construcción pET30a-PeIB-SmbP-hGH y pET30a-CusF3H+-hGH

Una vez terminadas las construcciones, se enviaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, para confirmar que la construcción se llevó a cabo de forma correcta.

Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron interpretados con ayuda de el software Finch TV (ver Figura 9 y Figura 10). La secuenciación dio un resultado positivo por lo que se confirmó que las construcciones fueron hechas de forma correcta.



Figura 9. Secuenciación de la construcción pET30a-PeIB-SmbP-hGH

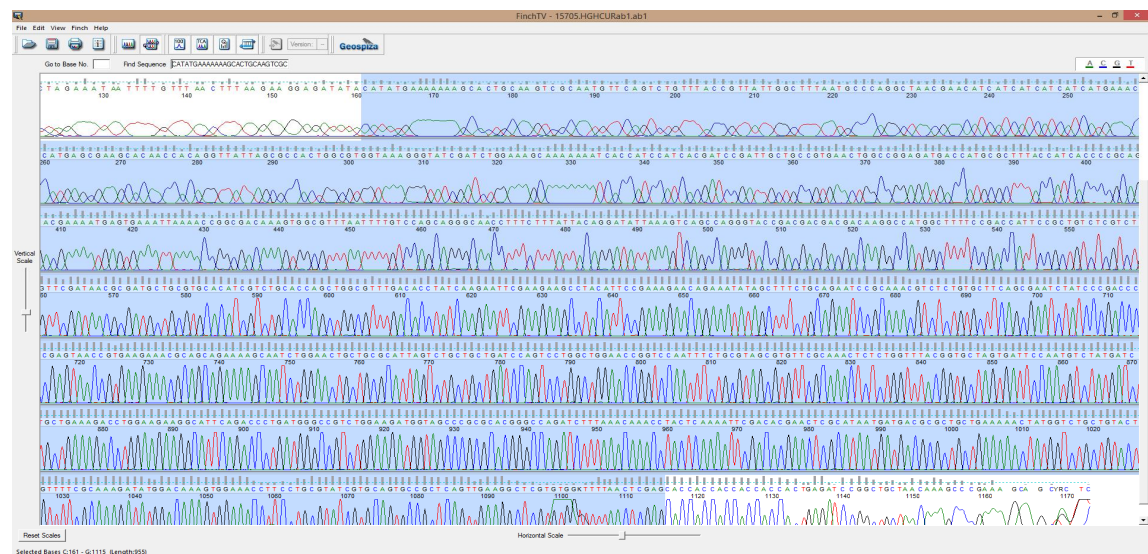


Figura 10. Secuenciación de la construcción pET30a-CusF3H+-hGH

5.5 Expresión piloto y análisis por SDS-PAGE de las construcciones pET30a-PelB-SmbP-hGH y pET30a-CusF3H+-hGH

Se corrió un SDS-PAGE (ver Figura 11), en el gel se muestran tanto la fracción soluble (FS) como la fracción insoluble (FI) de cada expresión, en el primer carril se puede observar el marcador de peso molecular, en el último se observa el control negativo correspondiente a un lisado de *E. coli* BL21(DE3) sin plásmido, del carril 2 al 4 se muestra la expresión PelB-SmbP-hGH y del carril 6 al 9 se muestra la expresión de CusF3H+-hGH.

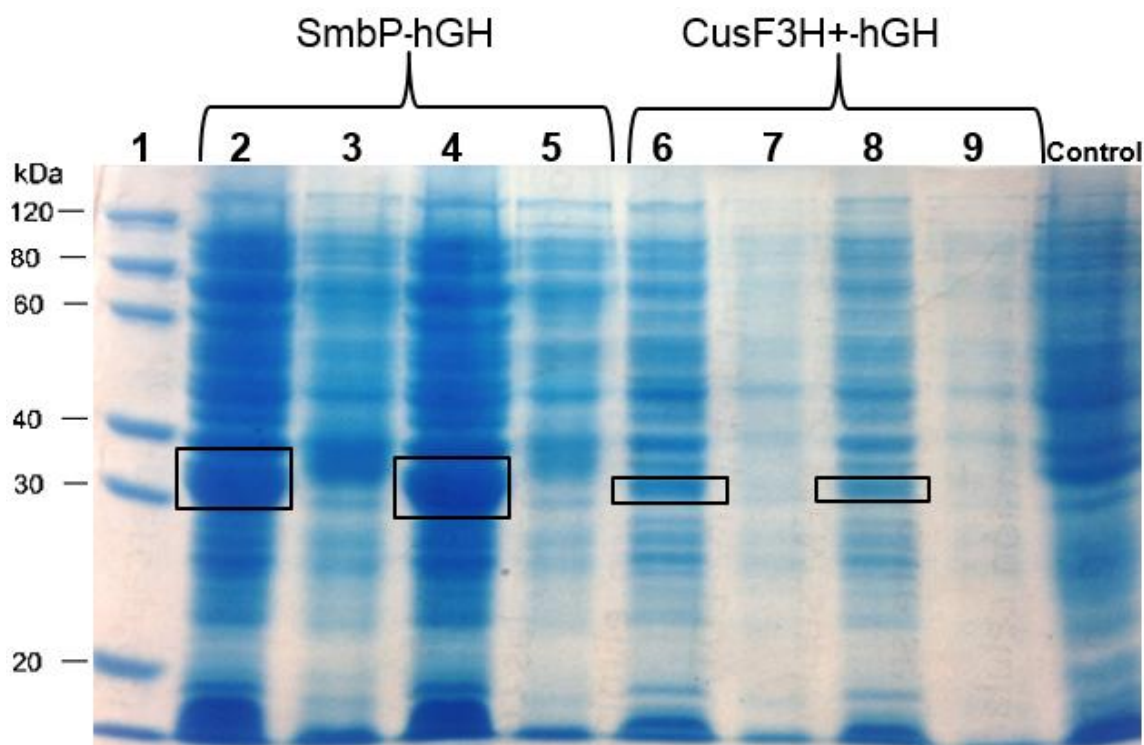


Figura 11. Expresión piloto de la hGH con las proteínas de fusión PelB-SmbP y CusF3H+. Carril 1 : Marcador de peso molecular, Carriles: 2,4,6 y 8: Fracciones solubles y Carriles: 3,5,7 y 9: Fracciones Insolubles.

5.6. Segunda expresión piloto de proteínas

En esta expresión se usó el método de extracción lisozima/choque osmótico para la extracción de las proteínas. Se llevó a cabo el análisis por SDS-PAGE de PelB-SmbP-hGH (ver Figura 12) donde se puede observar en el carril 1 el marcador de peso molecular, en el carril 2 y 4 la fracción hipotónica, en los carriles 3 y 5 la fracción hipertónica y en ultimo carril el control negativo correspondiente a un lisado de *E. coli* BL21(DE3) sin plásmido. Se obtuvieron bandas por encima de los 30 kD, lo cual está dentro de lo esperado ya que el peso de la hGH más la proteína de fusión es de 32 kD.

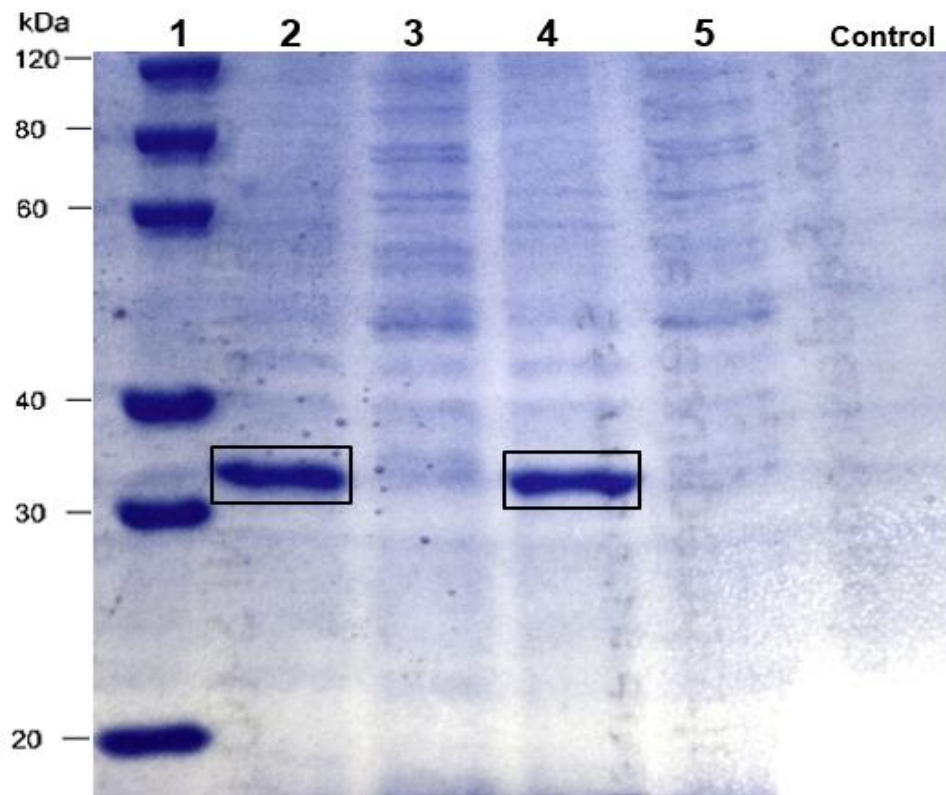


Figura 12. Expresión piloto de la hGH con la proteína de fusión PelB-SmbP. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carriles 2 y 4 fracción hipotónica y Carriles: 3 y 5 fracción hipertónica.

También se llevó a cabo el gel correspondiente a la construcción con CusF3H+ (ver Figura 13), se puede observar en el carril 2 y 4 (fracción hipotónica) bandas arriba de los 30 kD esto concuerda con el peso esperado de la hGH (32 kD) en los carriles 3 y 5 la fracción hipertónica y en ultimo carril el control negativo correspondiente a un lisado de *E. coli* BL21(DE3) sin plásmido.

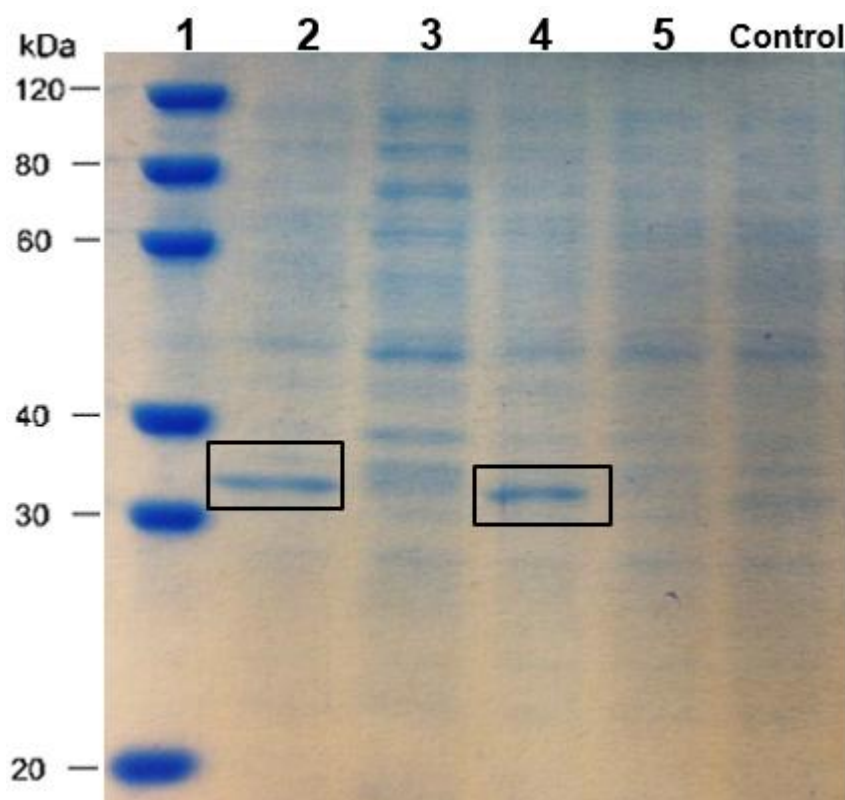


Figura 13. Expresión piloto de la hGH con la proteína de fusión CusF3H+. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carriles 2 y 4 fracción hipotónica y Carriles: 3 y 5 fracción hipertónica.

5.7 Expresión de la hGH usando 1 L de medio de cultivo

Se realizó un SDS-PAGE para visualizar las fracciones obtenidas usando PelB-SmbP (ver Figura 14) y CusF3H+ (ver Figura 15).

En la expresión con PelB-SmbP se puede observar en el carril 2 la proteína antes de la purificación y en los carriles del 3 al 7 las fracciones eluidas de la resina.

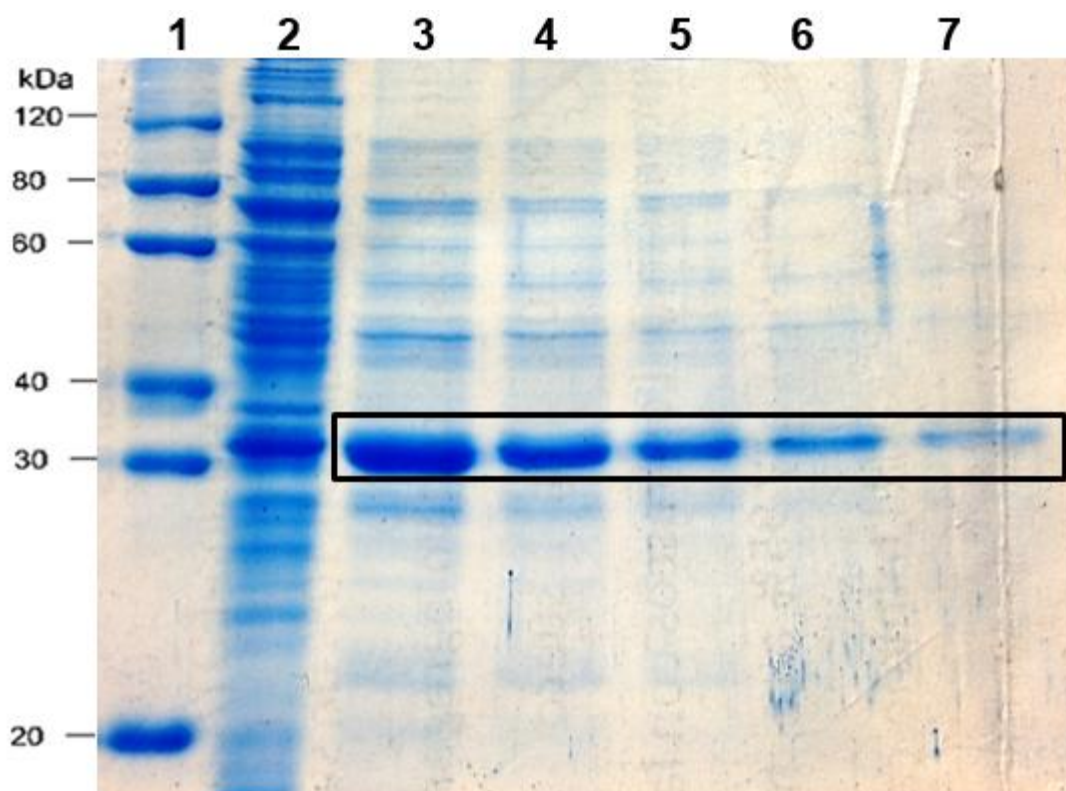


Figura 14. Expresión a 1 L de cultivo con la proteína de fusión PelB-SmbP (32kD). Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: PelB-SmbP-hGH sin purificar y Carriles 3-7: Fracciones de elución.

En la expresión con CusF3H+ se puede observar en el carril 2 la proteína antes de la purificación y en los carriles del 3 al 7 las fracciones eluidas de la resina.

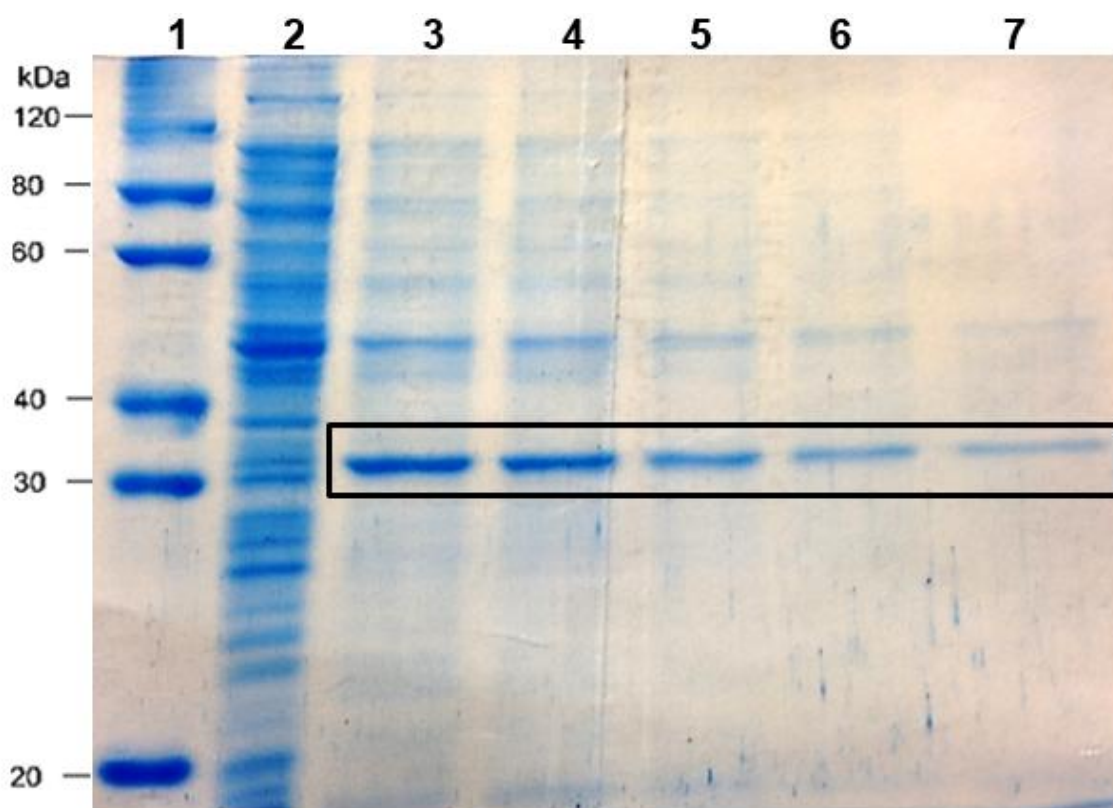


Figura 15. Expresión a 1 L de cultivo con la proteína de fusión CusF3H+ (32kD). Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: CusF3H+-hGH sin purificar y Carriles 3-7: Fracciones de elución.

5.8 Corte de la proteína de fusión

A las fracciones obtenidas de la primera purificación se les realizó una diálisis para eliminar el imidazol, se cuantificó la concentración de la proteína por el método Bradford descrito en la sección 4.7, en la Tabla 3 se muestran los datos utilizados para la curva de calibración, los cuales fueron graficados (ver Figura 16) para obtener la ecuación de la recta y en la Tabla 4 se muestran las absorbancias obtenidas por las muestras.

Tabla 3. Datos de la curva de calibración para el método Bradford

	Concentración de estándares	Volumen de muestra	Reactivo Bradford	Absorbancia 595 nm
Estándar 1	1.0 mg/ml	5 µL	200 µL	0.616
Estándar 2	0.8 mg/ml	5 µL	200 µL	0.532
Estándar 3	0.6 mg/ml	5 µL	200 µL	0.467
Estándar 4	0.4 mg/ml	5 µL	200 µL	0.397
Estándar 5	0.2 mg/ml	5 µL	200 µL	0.307
Estándar 6	0.1 mg/ml	5 µL	200 µL	0.275

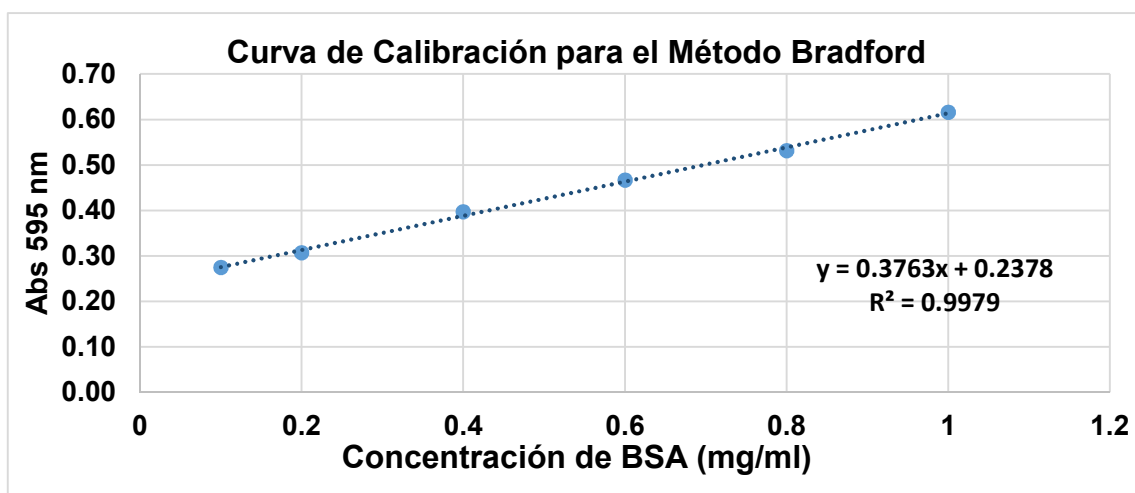


Figura 16. Gráfica de la curva de calibración del método Bradford a 595 nm.

Tabla 4. Absorbancias de PelB-SmbP-hGH y CusF3H+-hGH.

	SmbP			CusF3H+		
Muestra 1:1	0.382	0.384	0.381	0.279	0.283	0.284
Promedio	0.382			0.282		

Según los cálculos realizados utilizando la ecuación de la recta y la absorbancia de las muestras, se obtuvo que la concentración de PelB-SmbP-hGH era de 0.766 mg/mL y mientras que la de CusF3H+-hGH era de 0.234 mg/ml. Después de haber obtenido la concentración de proteína se realizó el corte con la enteroquinasa de cadena ligera (NEB).

5.9 Segunda cromatografía de afinidad

Una vez cortada la proteína de fusión se realizó la segunda cromatografía de afinidad de acuerdo al método descrito en la sección 4.6.2.1, esto con el fin de retirar la proteína de fusión que fue cortada con anterioridad y eliminar algunos contaminantes que aun pudieran estar presentes, al terminar se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% del corto y la purificación de las dos construcciones PelB-SmbP (ver Figura 17) y CusF3H+ (ver Figura 18).

En la Figura 17 podemos observar en el carril 2 la proteína antes de ser cortada por la enteroquinasa de cadena ligera, en el carril 3 se pueden apreciar dos bandas una perteneciente a nuestra proteína de fusión (10 kD) y la otra a la hGH (22 kD), además, en los carriles 4 al 6 se aprecia la hGH pura.

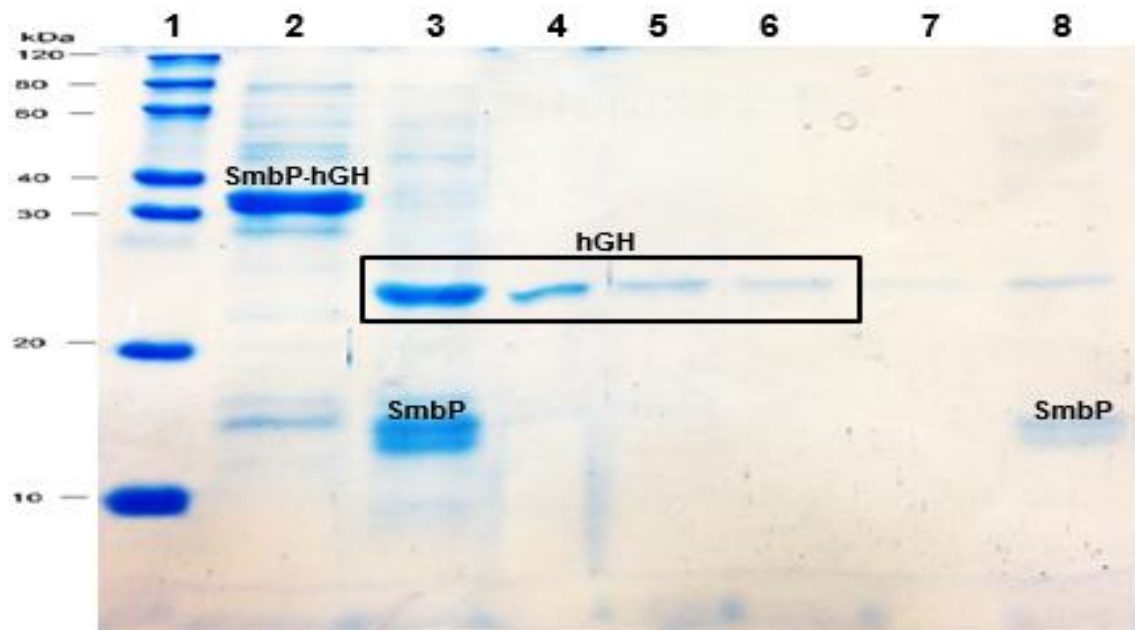


Figura 17. SDS-PAGE al 15% de la remoción de la proteína PelB-SmbP de hGH usando enteroquinasa de cadena ligera. Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: Construcción, Carril 3: Corte con enteroquinasa, Carril 4: hGH pura, Carril 5 -7: fracciones de lavado y Carril 8: elución de la proteína de fusión.

En la Figura 18 podemos observar en el carril 2 la proteína antes de ser cortada por la enteroquinasa de cadena ligera, en el carril 3 se pueden apreciar dos bandas una perteneciente a nuestra proteína de fusión (10 kD) y la otra a la hGH (22 kD), además, en los carriles 4 la hGH pura.

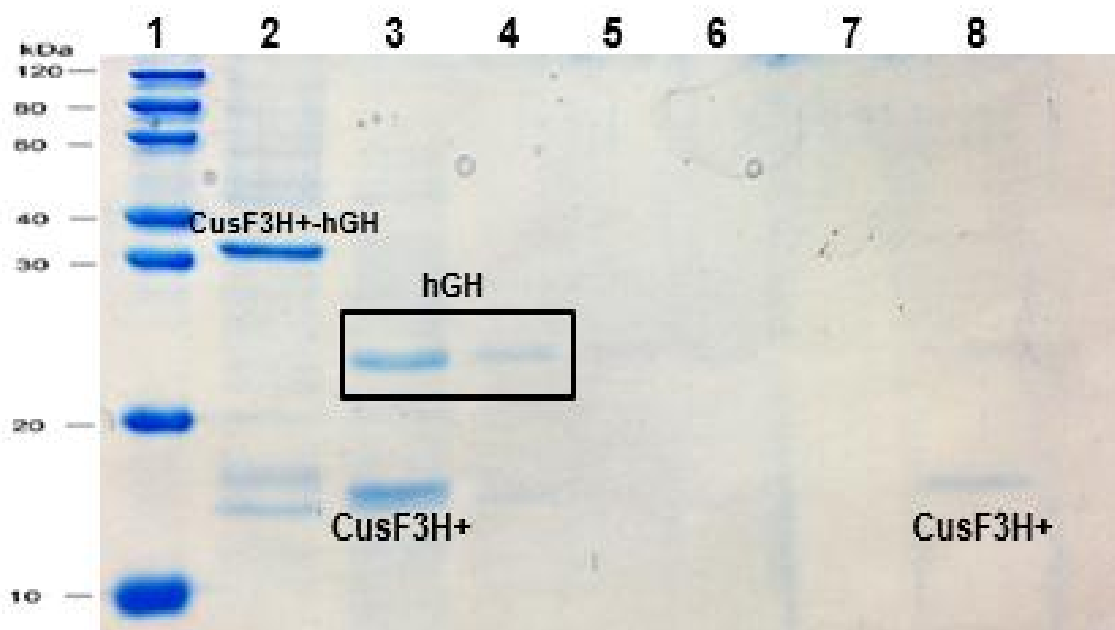


Figura 18. SDS-PAGE al 15% de la remoción de la proteína CusF3H+ de hGH usando enteroquinasa de cadena ligera. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: Construcción, Carril 3: Corte con enteroquinasa, Carril 4: hGH pura, carril 5 -7: fracciones de lavado y Carril 8: elución de la proteína de fusión.

5.10 Expresión a 1 L de medio de cultivo y purificación mediante IMAC empleando el sistema cromatográfico ÄKTA prime plus

En la siguiente gráfica (ver Figura 19) podemos observar el cromatograma de elución obtenido con el equipo de FPLC ÄKTA prime plus. Se puede apreciar claramente el pico de elución para PelB-SmbP-hGH, este pico es característico cuando se realiza la elución en un solo paso, en este caso se utilizó para eluir una solución amortiguadora que contuviera imidazol a una concentración de 200 mM.

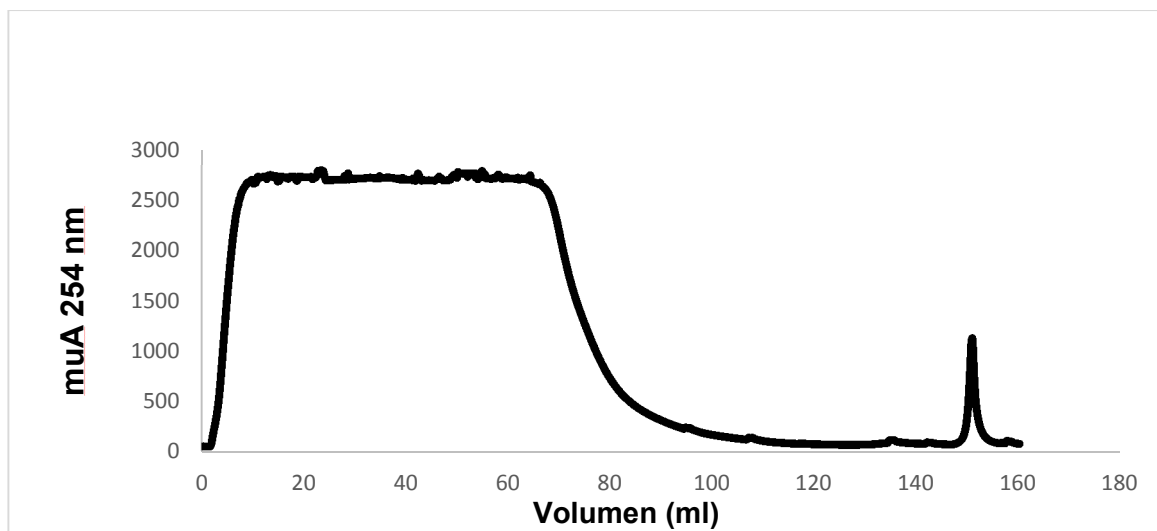


Figura 19. Cromatograma de Afinidad con Ni(II) para PeIB-SmbP-hGH

Se realizó un SDS-PAGE para visualizar las fracciones obtenidas usando PeIB-SmbP (ver Figura 20).

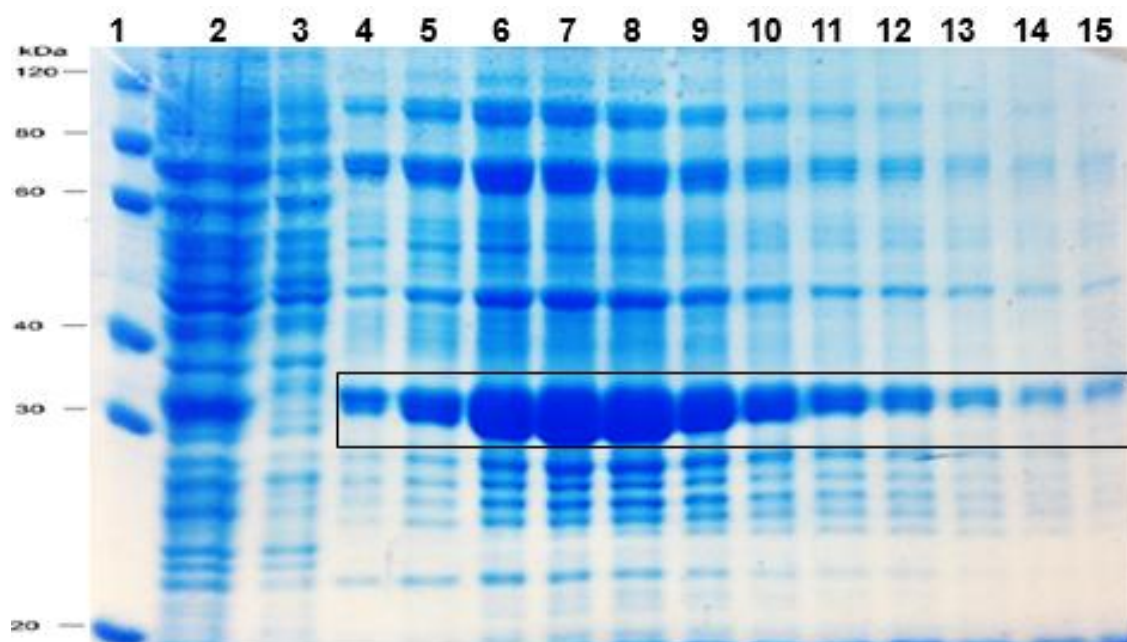


Figura 20. SDS-PAGE al 12% de la purificación de PeIB-SmbP-hGH mediante cromatografía de afinidad. Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: PeIB-SmbP-hGH sin purificar, Carril 3: Fracción no unida, Carril 4-15: fracciones de elución.

5.11 Cromatografía de intercambio aniónico

En la siguiente gráfica (ver Figura 21) podemos observar el cromatograma de elución obtenido. Alrededor de los 120 ml se puede observar claramente el pico perteneciente a PelB-SmbP-hGH.

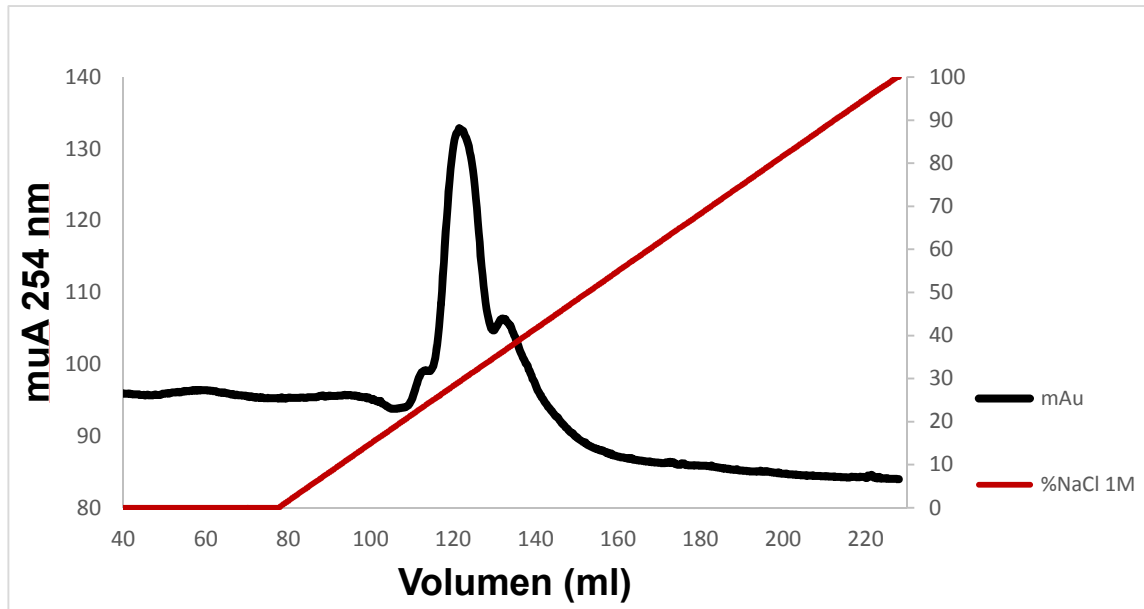


Figura 21. Cromatograma de intercambio aniónico para PelB-SmbP-hGH.

Al terminar la purificación se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (ver Figura 22). En el carril 2 se puede apreciar la proteína antes de su purificación y del carril 10 al 29 la proteína eluida de la columna.

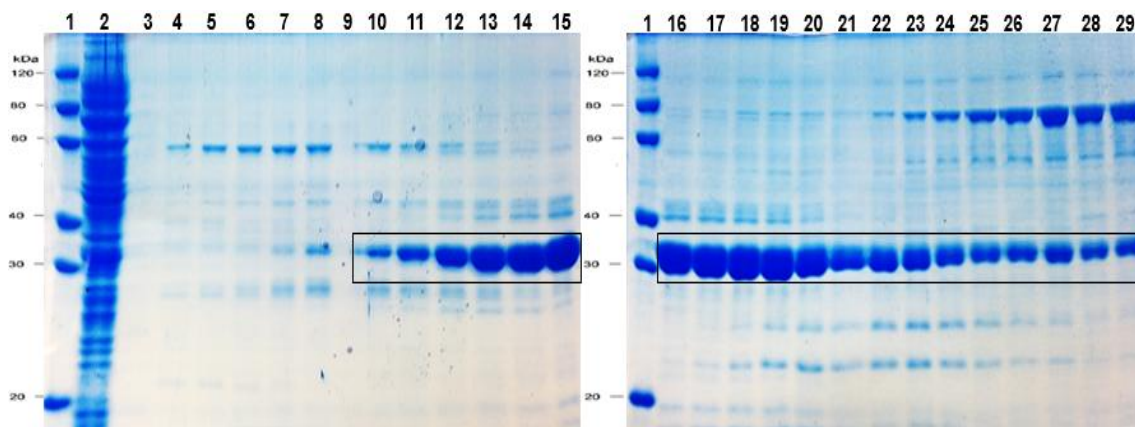


Figura 22 SDS-PAGE al 12% de la purificación de PelB-SmbP-hGH mediante intercambio aniónico. Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: PelB-SmbP-hGH sin purificar, Carril 3: Fracción no unida, Carril 4-29: fracciones de elución.

5.12 Segunda expresión a 1 L de medio de cultivo y purificación mediante IMAC empleando el sistema cromatográfico ÄKTA prime plus.

Se siguió la metodología descrita en la sección 5.10 con una variante, al momento de la purificación se usó un gradiente de concentración de 0 a 100% de una solución amortiguadora que contenía 200 mM imidazole 50 mM, Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0 para eluir la proteína.

Se realizaron cuatro geles de poliacrilamida al 12% para visualizar las fracciones de elución (ver Figura 23 y 24). En el carril 2 se puede apreciar la fracción hipotónica, en el carril 3 la fracción hipertónica ambas obtenidas del choque osmótico y del carril 9 al 50 la proteína después de la purificación.

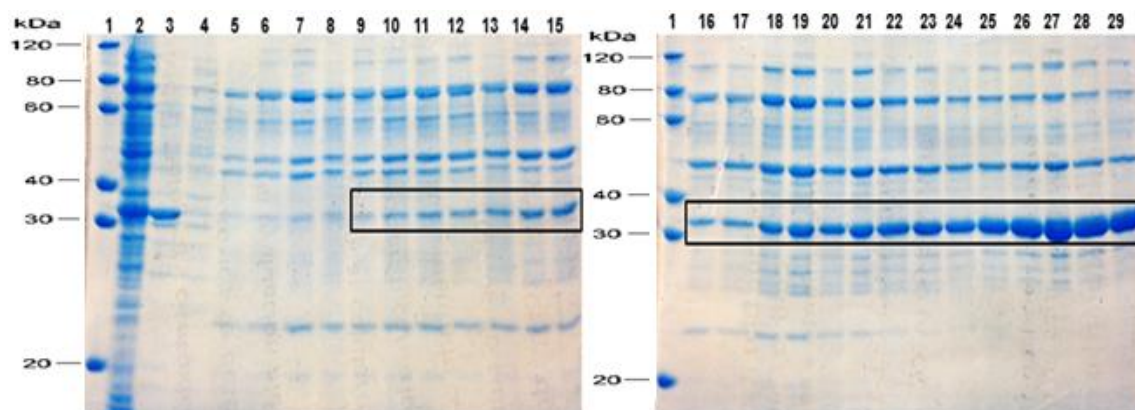


Figura 23. SDS-PAGE al 12% de la purificación de PeIB-SmbP-hGH mediante IMAC. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2 : Fracción hipotónica, Carril 3: Fracción hipertónica y carriles: 4-29 fracciones de elución.

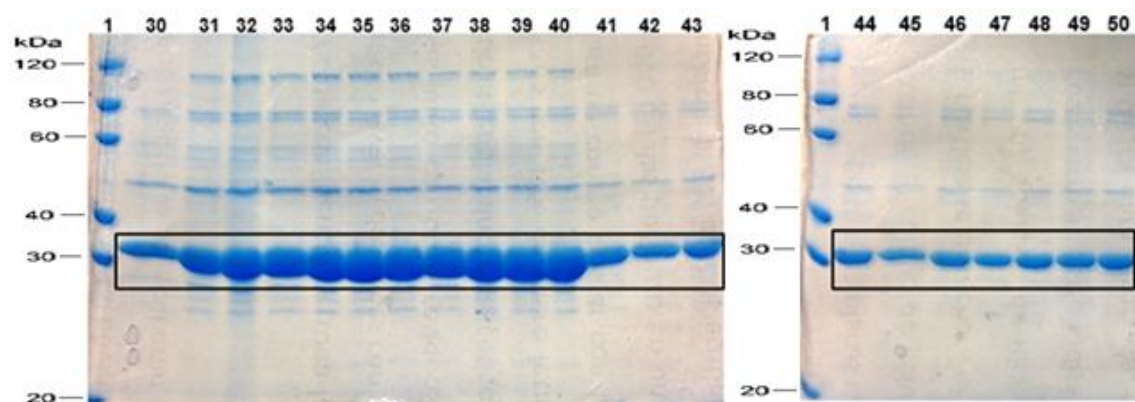


Figura 24. SDS-PAGE al 12% de la purificación de PeIB-SmbP-hGH mediante IMAC. Carril 1: Marcador de peso molecular y Carriles: 30-50 fracciones de

5.13 Corte de la proteína de fusión

A las fracciones obtenidas en la sección 5.12 se les realizó una diálisis para eliminar el imidazol, se cuantificó la concentración de la proteína por el método Bradford descrito en la sección 4.7 , en la Tabla 5 se muestran los datos utilizados para la curva de calibración, los cuales fueron graficados (ver Figura 25) para obtener la ecuación de la recta y en la Tabla 6 se muestran las absorbancias obtenidas por las muestras.

Tabla 5. Datos de la curva de calibración para el método Bradford.

	Concentración de estándares	Volumen de muestra	Reactivo Bradford	Absorbancia 595 nm
Estándar 1	1.0 mg/ml	5 µL	200 µL	0.604
Estándar 2	0.8 mg/ml	5 µL	200 µL	0.524
Estándar 3	0.6 mg/ml	5 µL	200 µL	0.453
Estándar 4	0.4 mg/ml	5 µL	200 µL	0.365
Estándar 5	0.2 mg/ml	5 µL	200 µL	0.290
Estándar 6	0.1 mg/ml	5 µL	200 µL	0.245

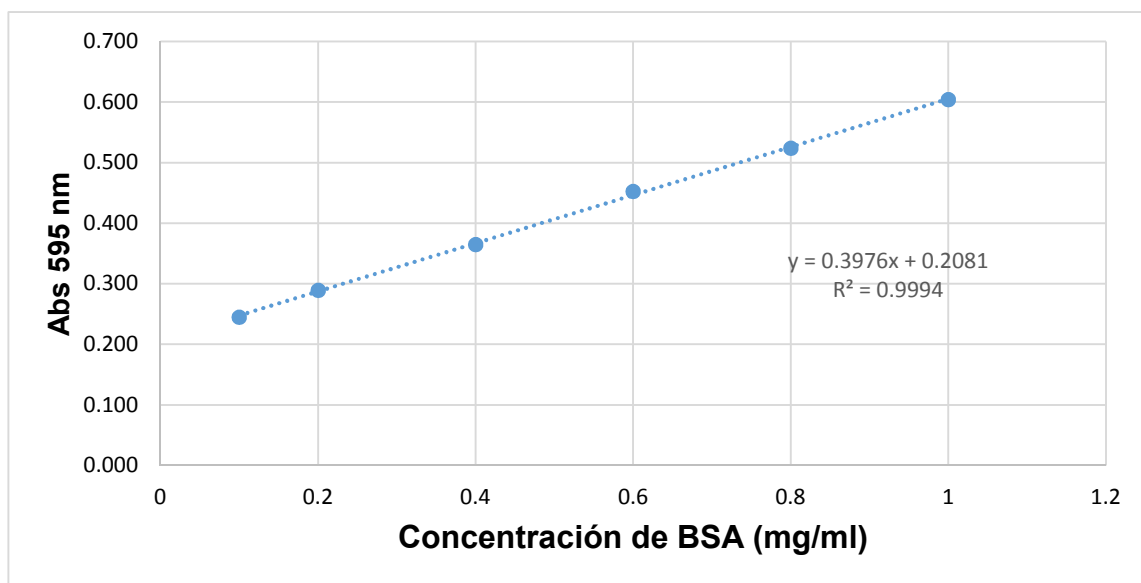


Figura 25. Gráfica de la curva de calibración del método Bradford a 595 nm.

Tabla 6. Absorbancias de PelB-SmbP-hGH.

	SmbP		
Muestra 1:1	0.430	0.431	0.447
Promedio	0.436		

Según los cálculos realizados utilizando la ecuación de la recta y la absorbancia de las muestras, se obtuvo que la concentración de PelB-SmbP-hGH era de 24.1 mg por litro de cultivo LB.

Después de haber obtenido la concentración de proteína se realizó el corte con la enteroquinasa de cadena ligera.

5.14 Segunda cromatografía de afinidad

Una vez cortada la proteína de fusión se realizó la segunda cromatografía de afinidad de acuerdo al método descrito en la sección 4.6.2.1, esto con el fin de retirar la proteína de fusión que fue cortada con anterioridad y eliminar algunos contaminantes que aun pudieran estar presentes, al terminar se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% tanto del corto como de la purificación (ver Figura 26). En este gel se puede observar en el carril 2 la proteína antes de ser cortada por la enteroquinasa, en el carril 3 el corte y en los carriles 4 y 5 la hGH pura.

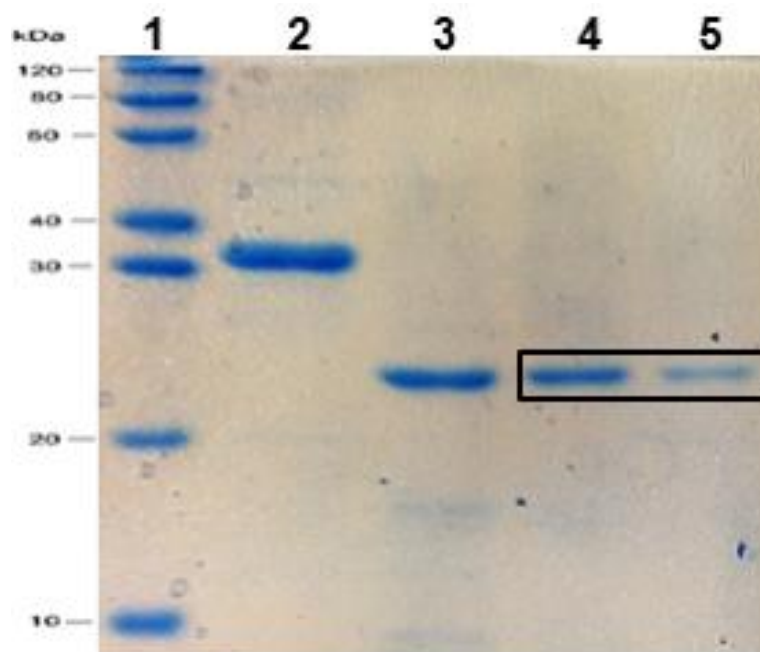


Figura 26. SDS-PAGE al 15% de la remoción de la proteína PelB-SmbP de hGH usando enteroquinasa de cadena ligera. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril: 2 PelB-SmbP-hGH, carril 3 : Corte con enteroquinasa, carril: 4 y 5 hGH purificada.

Al finalizar se cuantifico la concentración de la proteína por el método Bradford descrito en la sección 4.7 para conocer la concentración final una vez terminado todo el proceso.

En la Tabla 7 se muestran los datos utilizados para la curva de calibración, los cuales fueron graficados (ver Figura 27) para obtener la ecuación de la recta y en la Tabla 8 se muestran las absorbancias obtenidas por las muestras.

Tabla 7. Datos de la curva de calibración para el método Bradford.

	Concentración de estándares	Volumen de muestra	Reactivo Bradford	Absorbancia 595 nm
Estándar 1	1.0 mg/ml	5 µL	200 µL	0.867
Estándar 2	0.8 mg/ml	5 µL	200 µL	0.777
Estándar 3	0.6 mg/ml	5 µL	200 µL	0.672
Estándar 4	0.4 mg/ml	5 µL	200 µL	0.538
Estándar 5	0.2 mg/ml	5 µL	200 µL	0.415
Estándar 6	0.1 mg/ml	5 µL	200 µL	0.336

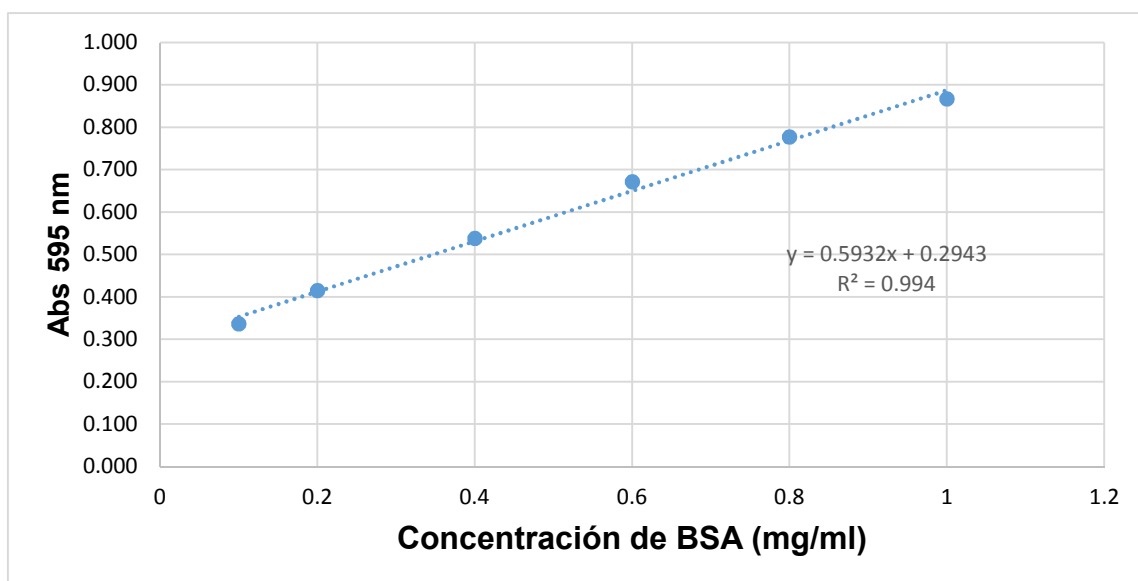


Figura 27. Gráfica de la curva de calibración del método Bradford a 595 nm.

Tabla 8. Absorbancias de la hGH.

	SmbP		
Muestra 1:1	0.519	0.516	0.517
Promedio	0.517		

Según los cálculos realizados utilizando la ecuación de la recta y la absorbancia de las muestras, se obtuvo que la concentración final de la hGH era de 15.8 mg por litro de cultivo LB.

CAPÍTULO 6

6. Discusiones

6.1 Discusión de resultados

En el presente trabajo se realizaron dos construcciones para la expresión de una proteína de importancia farmacéutica, como lo es la hormona del crecimiento humana, usando como hospedero la enterobacteria *E. coli*.

La secuencia que codifica para la hGH fue optimizada y sintetizada (GeneScript) para su expresión en *E. coli*.

Muchas proteínas, especialmente proteínas humanas, tienen secuencias de mRNA que incluyen codones que se usan con poca frecuencia en *E. coli* (codones raros), el tener este tipo de codones en nuestra secuencia conlleva a problemas en la traducción, por este motivo se lleva a cabo la optimización, la cual consiste en el cambio de estos codones raros por codones sinónimos que son empleados comúnmente por el organismo que se usara como hospedero. Este proceso es de suma importancia ya que se ha demostrado que la optimización puede afectar en gran medida la conformación y la función de las proteínas, y aumentar los niveles de expresión [20, 36].

Este proceso es muy usado en sistemas de expresión procariota y ya se ha usado con anterioridad para expresar la hGH [15, 24, 30].

Se sabe que uno de los principales problemas del uso de *E. coli* como hospedero es la formación de cuerpos de inclusión, estos agregados insolubles de proteína no activa hacen que el proceso de purificación se más largo y caro. Por este motivo, la producción del metabolito de interés se llevó a cabo en el periplasma de *E. coli*, esto, además de evitar la formación de cuerpos de inclusión, fomenta la formación de puentes disulfuro.

Para realizar las construcciones se usaron las proteínas de fusión SmbP y CusF. Al ser CusF y SmbP proteínas nativas del periplasma de *E. coli* y *N. europea* respectivamente, ya contaban con el péptido señal necesario para su transporte hasta el periplasma.

En el caso de CusF se decidió conservar el péptido señal nativo ya que según lo descrito por Cantú-Bustos et al. [23] al usar este péptido señal se obtenían buenos niveles de expresión en el periplasma.

Observando los resultados obtenidos por Vargas-Cortez et al. [21] se optó por retirarle a SmbP su péptido señal nativo y remplazarlo con el péptido señal de la Pectato liasa B (PelB) el cual es nativo de la enterobacteria *Erwinia carotovora*. Se optó por PelB ya que se han obtenido mejores resultados que con el péptido señal nativo [35].

Se llevó a cabo la primera expresión piloto para observar, si la proteína se había producido, y si esta proteína producida era soluble o generaba cuerpos de inclusión.

Al visualizar la expresión piloto mediante electroforesis de gel de poliacrilamida se observó que tanto PelB-SmbP-hGH como CusF3H+-hGH presentaban una banda a los 32 kD (ver Figura 11 carriles 2, 4 ,6 y 8), esta banda que no se encuentra presente en la expresión control (ver Figura 11 ultimo carril) es la suma del peso de la proteína de fusión utilizada (tanto SmbP como CusF3H+ tienen un peso aproximado de 10 kD) más la hGH (la cual tiene un peso de 22 kD), esto nos indicó que *E. coli* estaba expresando nuestra proteína de interés, además, se pudo observar que esta banda solo estaba presente en la fracción soluble, lo que nos indica que la formación de cuerpos de inclusión es muy poca o nula.

La baja formación de cuerpos de inclusión se debe al uso de las proteínas de fusión, a la optimización de los codones, así como a la temperatura a la que se expresó (25 °C). Se ha demostrado en estudios anteriores que a menor temperatura de expresión mayor es la hGH soluble que se obtiene [25, 31, 35].

La técnica empleada para la extracción de la proteína en la primera expresión piloto fue una lisis total de la biomasa, de acuerdo a lo descrito por Vargas-Cortez et al [21], sin embargo nuestro objetivo no era lisar en su totalidad la bacteria si no extraer la proteína del espacio periplásmico.

En la segunda expresión piloto se utilizó el método descrito por French et al. para extraer la proteína. Este método es una combinación del método lisozima/EDTA y el método de choque osmótico. La lisozima es una enzima que cataliza la degradación del enlace entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina los cuales son componentes del peptidoglicano [37].

El peptidoglicano es un polímero con diversas funciones en la bacteria, una de las cuales es proteger a la bacteria de una ruptura osmótica. Este proceso de degradación facilita la realización del choque osmótico lo que conlleva a mejores rendimientos en la extracción de la proteína [37, 38].

Al realizar el método lisozima/choque osmótico se obtiene dos tipos de fracciones hipertónicas e hipotónicas para visualizar estas fracciones se llevaron a cabo geles de poliacrilamida al 12%. En la figura 12 se muestran las fracciones hipotónicas e hipertónicas de la proteína expresada con PelB-SmbP mientras que en la figura 13 se observa las fracciones obtenidas usando CusF3H⁺, en los geles se puede apreciar que en la expresión control no hay proteína producida.

Se pudieron observar las bandas de la expresión alrededor de los 32 kD, el cual es el peso esperado de la hGH más la a proteína de fusión utilizada, esto nos indica que la extracción se está llevando de manera adecuada.

La proteína está presente en su mayoría en la fracción hipotónica, esto se debe a que al momento de usar el buffer hipertónico la lisozima aún no ha tenido tiempo de realizar su función, mientras que al emplear el buffer hipotónico la lisozima ya ha estado un tiempo considerable en contacto con el peptidoglicano,

el cual probablemente este degradado en su totalidad facilitando la expulsión de la proteína del espacio periplásmico.

Al comparar los SDS-PAGE de las dos tipos de extracciones, se puede observar, que la cantidad de contaminantes utilizando el método lisozima/choque osmótica es menor que utilizando lisis, esta es una de las ventajas de usar el periplasma para la expresión de proteínas. El bajo número de contaminantes se debe a que solamente alrededor del 4 % de las proteínas de *E. coli* se encuentran presentes en el periplasma, lo cual facilita en cierta medida nuestro proceso de purificación, además, la cantidad de proteasas presentes en el periplasma es mínima lo cual da como resultado más proteína biológicamente activa y estable [8, 13, 16].

Una vez que se confirmó que la proteína de interés se podía producir y extraer satisfactoriamente del periplasma de *E. coli* se procedió a expresar la hGH en un litro de cultivo, para esto se emplearon los mismos parámetros utilizados que en la expresión piloto, así como el método de lisozima/choque osmótico para su extracción del hospedero.

Se realizó la purificación PelB-SmbP-hGH y de CusF3H⁺-hGH utilizando cromatografía de afinidad con metales inmovilizados utilizando iones Ni(II).

IMAC es una técnica cromatográfica que se basa en la afinidad conocida de iones metálicos de transición tales como Zn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ y Co²⁺ a histidina y cisteína en soluciones acuosas. Como ya se había mencionado con anterioridad tanto SmbP como CusF3H⁺ son afines a iones metálicos, y se optó por el uso de

Ni(II) ya que estudios anteriores muestran mejores resultados usando este metal [21, 22].

Al realizar la extracción se observó que las fracciones obtenidas tenían una alto grado de viscosidad, esto dificulta la purificación al aumentar la presión en la columna utilizada. Ya que se deseaba tener la proteína en las mejores condiciones posibles para su posterior purificación se optó por realizar una diálisis antes de la purificación, esta diálisis además de disminuir el grado de viscosidad de la muestra prepara los grupos funcionales presentes en las proteínas de fusión para su mejor unión al níquel.

Después de realizada la diálisis se procedió con la purificación donde se realizó una elución en un solo paso. Los residuos de histidina presentes en las proteínas de fusión forman enlaces covalentes coordinados con el Ni(II) por este motivo se usó una solución amortiguadora de elución que contuviera 200 mM de imidazol. El imidazol compite por los sitios de coordinación presentes en el Ni(II) y eventualmente desplaza a la proteína de fusión y esta es eluida junto con la proteína de interés [39, 40].

Se realizó un SDS-PAGE para visualizar las fracciones obtenidas usando PelB-SmbP-hGH (ver Figura 14) y CusF3H⁺-hGH (ver Figura 15), se pudieron observar las bandas de 32 kD, esto nos indica que tanto la expresión como la purificación se llevó a cabo de forma satisfactoria .

Posteriormente se realizó la remoción de la proteína PelB-SmbP y CusF3H⁺ de la hGH utilizando la enzima enteroquinasa de cadena ligera. La

enteroquinasa es una de las enzimas más utilizadas para la remoción de proteínas de fusión por su alta especificidad, además puede ser empleada en presencia de diversos detergentes sin verse afectada su actividad y tiene una alta tasa de recuperación comparada con otras enzimas [41–43].

Después el corte con enteroquinasa se realizó la segunda cromatografía de afinidad, esto con la finalidad de remover la proteína de fusión así como eliminar algunos contaminantes que aun pudieran estar presentes.

Se realizó un SDS-PAGE para visualizar el corte con la enteroquinasa y la segunda purificación, tanto de PelB-SmbP-hGH (ver Figura 17) como de CusF3H+-hGH (ver Figura 18). En el carril 2 de estos geles se puede observar la proteína antes de purificar, al comparar contra el carril 4 es evidente la disminución de los contaminantes, esto nos indica que la purificación se llevó a cabo de forma satisfactoria y el grado de pureza obtenido fue alto.

En los carriles 3 se pueden observar dos bandas una de aproximadamente 22 kD la cual es perteneciente a la hGH y la otra de aproximadamente 15 kD la cual pertenece a la proteína de fusión utilizada.

La presencia de estas dos bandas nos indica que la enteroquinasa realizó su función de forma correcta y separó la proteína de fusión de la proteína de interés.

Las bandas pertenecientes a las proteínas de fusión están un poco más arriba del peso esperado, si bien aún no está claro el mecanismo por el cual

sucede esto, se cree que tiene relación con la cantidad de SDS que se une a la proteína [44, 45].

Estas purificaciones se realizaron empleando la resina Profinity™ de Bio-Rad, y si bien la proteína obtenida tenía un alto grado de pureza, se optó por usar el sistema cromatográfico ÄKTA prime plus, esto con la finalidad de buscar mejores resultados en la purificación al usar un equipo automatizado, en adición a esto, al observar los resultados obtenidos se optó por seguir los experimentos usando solamente a PelB-SmbP.

Se optó por PelB-SmbP ya que los niveles de expresión son mayores que con CusF3H+, esto se debe a que el péptido señal PelB, posee una región -h más hidrofóbica que el péptido señal de CusF3H+, se ha demostrado que el aumento de la hidrofobicidad en esta región aumenta los niveles de expresión en el periplasma [46].

Se realizó otra expresión con un litro de medio de cultivo y se visualizó en SDS-PAGE (ver Figura 20), al comparar el carril 2 (clarificado antes de la segunda purificación) contra el carril 3 (fracción no unida) se observa que no hay proteína en la fracción no unida, esto es muy importante ya que nos indica que nuestra proteína se está pegando en su totalidad a la resina.

Al observar las eluciones obtenidas (carriles del 4 al 15) se decidió cambiar el tipo de elución, en lugar de utilizar la elución en un solo paso se decidió usar un gradiente de imidazol de 0 a 200 mM para así obtener un mayor grado de pureza.

Una vez realizada la elución con gradiente se pudo observar (ver Figura 23 y 24) que el grado de pureza de la proteína obtenida era mayor en comparación a las purificaciones que se llevaron a cabo con anterioridad. Para esta purificación se usaron tanto la fracción hipotónica como la hipertónica, esto se decidió ya que las bandas de la proteína presentes en las dos fracciones eran de un tamaño considerable.

Se calculó la concentración de proteína obtenida mediante el método Bradford, la concentración de PelB-SmbP-hGH fue de 24.1 mg/L de cultivo, lo cual después de remover la proteína de fusión resulta en una concentración de hGH de 15.8 mg/L de cultivo, y como se puede observar en la figura 26 (carril 4 y 5) con un alto grado de pureza.

Los resultados obtenidos fueron comparados con lo reportado por Sockolosky et al [35]. En este trabajo se produjo hGH en el periplasma de *E. coli* usando PelB como péptido señal, realizando choque osmótico para la extracción de la proteína y empleando una etiqueta de histidinas para facilitar la purificación mediante IMAC con iones Ni(II), obteniendo un rendimiento promedio de 1.4 mg /L de hGH pura.

Al comparar los resultados obtenidos, se puede observar que el sistema de expresión empleado en nuestro proyecto es más efectivo a la hora de producir hGH en *E. coli*, ya que se produjo 10 veces más proteína que la producida por Sockolosky et al., este se puede atribuir principalmente a la proteína de fusión empleada (SmbP).

CAPÍTULO 7

7.- CONCLUSIONES

- 1.- Tanto PelB-SmbP como CusF3H⁺ presentan altos niveles de expresión de la hGH en el periplasma de *E. coli*.
- 2.- Los niveles de expresión son mayores usando PelB-SmbP que CusF3H⁺.
- 3.- Empleando el método de lisozima/choque osmótico se logró extraer la hGH del periplasma de *E. coli*.
- 4.- La expresión periplásmica combinada con el uso de PelB-SmbP y CusF3H⁺ incrementan de manera significativa la solubilidad de la hGH, evitando así la formación de cuerpos de inclusión.
- 4.- La cantidad de contaminantes presentes se disminuye de forma considerable al expresar nuestra proteína de interés en el periplasma, lo cual facilita en gran medida el proceso de purificación y ahorra costos.
- 5.- Se utilizó de forma efectiva la enteroquinasa de cadena ligera para separar la proteína de fusión de nuestra proteína de interés.

6.- Se puede utilizar de forma eficaz la cromatográfica de afinidad con Ni(II) para la purificación de PelB-SmbP-hGH y CusF3H+-hGH obteniendo altos niveles de pureza.

7.- Se obtuvieron 15.8 mg por litro de LB de hGH pura utilizando PelB-SmbP como proteína de fusión.

CAPÍTULO 8

8. PERSPECTIVAS

Tanto PelB-SmbP como CusF3H⁺ tiene un gran potencial para la expresión de proteínas que no se puedan producir de manera soluble en el citoplasma de *E. coli*, por lo que pudieran ser usadas para expresar diversas proteínas de interés industrial o farmacéutico.

Sería de vital importancia llevar a cabo pruebas de actividad biológica para saber si la hGH producida posee actividad y de ser así en qué medida es comparable al biofármaco que se encuentra actualmente en el mercado.

En adición a lo anterior tratar de optimizar a CusF3H⁺ intercambiando el péptido seña nativo por uno con mejores características, así como optimizar los procesos de expresión y purificación para poder obtener los mayores rendimientos posibles.

CAPÍTULO 9

9. SEGURIDAD EN EL TRABAJO. DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

La disposición de los residuos que se generaron durante el presente proyecto fueron gestionados de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL en el programa de Manejo Integral de Residuos.

Los residuos se dispusieron como se muestra en la siguiente tabla:

Colector	Residuo generado
Colector A (Soluciones Salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases orgánicas)	→ Solución amortiguadora TAE (Tris, ácido acético, EDTA) → TFB1 (RbCl, CaCl ₂ , MnCl ₂ , KAc, Glicerol) → Solución amortiguadora TGS (Tris, Glicina, SDS) → Solución hipertónica (Sacarosa, Tris-HCl, EDTA, Lisozima) → Solución amortiguadora de equilibrio (Tris-HCl, NaCl) Solución amortiguadora de elución (Tris-HCl, NaCl, Imidazol)
Colector G (Combinaciones orgánicas sólidas)	→ Agarosa → Poliacrilamida
Colorantes y lugol	→ Azul de Coomassie

REFERENCIAS

1. Dao LN, Lippe B, Laird M: **Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications**. Edited by Crommelin ADJ, Sindelar DR, Meibohm B. New York, NY: Springer New York; 2013:285–298.
2. Overton TW: **Recombinant protein production in bacterial hosts**. *Drug Discov Today* 2014, **19**:590–601.
3. Carter PJ: **Introduction to current and future protein therapeutics: A protein engineering perspective**. *Exp Cell Res* 2011, **317**:1261–1269.
4. Jozala AF, Geraldles DC, Tundisi LL, Feitosa V de A, Breyer CA, Cardoso SL, Mazzola PG, Oliveira-Nascimento L de, Rangel-Yagui C de O, Magalhães P de O, Oliveira MA de, Pessoa A: **Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification**. *Brazilian J Microbiol* 2016, **47**:51–63.
5. Rosano GL, Ceccarelli EA: **Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges**. *Front Microbiol* 2014, **5**:172.
6. Berlec A, Štrukelj B: **Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells**. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2013, **40**:257–274.
7. Becker J, Wittmann C: **Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for the heterologous production of high value molecules—a veteran at new shores**. *Curr Opin Biotechnol* 2016, **42**:178–188.
8. Mohamed N. Baeshen: **Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives**. *J microbiolgy Biotechnol* 2014, **25**:1–24.

9. Blount ZD: **The unexhausted potential of *E. coli***. *Elife* 2015, **4**:e05826.
10. Kamionka M: **Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli***. *Curr Pharm Biotechnol* 2011, **12**:268–274.
11. Terpe K: **Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, **72**:211.
12. Matos CFRO, Robinson C, Alanen HI, Prus P, Uchida Y, Ruddock LW, Freedman RB, Keshavarz-Moore E: **Efficient export of prefolded, disulfide-bonded recombinant proteins to the periplasm by the Tat pathway in *Escherichia coli* CyDisCo strains**. *Biotechnol Prog* 2014, **30**:281–290.
13. Salinas G, Pellizza L, Margenat M, Fló M, Fernández C: **Tuned *Escherichia coli* as a host for the expression of disulfide-rich proteins**. *Biotechnol J* 2011, **6**:686–699.
14. McDonald KA: **Heterologous Protein Expression**. Burlington: Academic Press; 2011:441–449.
15. Nguyen MT, Koo B-K, Thi Vu TT, Song J-A, Chong S-H, Jeong B, Ryu H-B, Moh S-H, Choe H: **Prokaryotic Soluble Overexpression and Purification of Bioactive Human Growth Hormone by Fusion to Thioredoxin, Maltose Binding Protein, and Protein Disulfide Isomerase**. *PLoS One* 2014, **9**:1–10.
16. Kaur J, Kumar A, Kaur J: **Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements**. *International Journal of Biological Macromolecules* 2017.

17. Rodríguez V, Asenjo JA, Andrews BA: **Design and implementation of a high yield production system for recombinant expression of peptides.** *Microb Cell Fact* 2014, **13**:65.
18. Waugh DS: **Making the most of affinity tags.** *Trends Biotechnol* 2005, **23**:316–320.
19. Berger S, Lowe P, Tesar M: **Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: Applications and challenges: Editor Stefan R Schmidt.** *MAbs* 2015, **7**:456–460.
20. Francis DM, Page R: **Strategies to Optimize Protein Expression in E . coli.** *Curr Protoc Protein Sci* 2010, **24**:1–29.
21. Vargas-Cortez T, Morones-Ramirez JR, Balderas-Renteria I, Zarate X: **Expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with a small metal-binding protein from *Nitrosomonas europaea*.** *Protein Expr Purif* 2016, **118**:49–54.
22. Vargas-Cortez T, Morones-Ramirez JR, Balderas-Renteria I, Zarate X: **Production of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with the fusion protein CusF3H⁺.** *Protein Expr Purif* 2017, **132**:44–49.
23. Cantu-Bustos JE, Vargas-Cortez T, Morones-Ramirez JR, Balderas-Renteria I, Galbraith DW, McEvoy MM, Zarate X: **Expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with the metal-binding protein CusF.** *Protein Expr Purif* 2016, **121**:61–65.
24. Levarski Z, Šoltýsová A, Krahulec J, Stuchlík S, Turňa J: **High-level**

expression and purification of recombinant human growth hormone produced in soluble form in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2014, **100:40–47.**

25. Savari M, Hamid S, Esfahani Z, Edalati M, Biria D: **Optimizing conditions for production of high levels of soluble recombinant human growth hormone using Taguchi method. *PROTEIN Expr Purif* 2015, **114**:128–135.**

26. Lindholm J: **Growth hormone: Historical notes. *Pituitary* 2006, **9**:5–10.**

27. Kopchick JJ: **History and Future of Growth Hormone Research. *Horm Res Paediatr* 2003, **60**(suppl 3):103–112.**

28. Goeddel D V, Heyneker HL, Hozumi T, Arentzen R, Itakura K, Yansura DG, Ross MJ, Miozzari G, Crea R, Seeburg PH: **Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* 1979, **281**:544–548.**

29. Kolarova J, Ammerpohl O, Gutwein J, Welzel M, Baus I, Riepe FG, Eggermann T, Caliebe A, Holterhus P, Siebert R, Bens S: **In vivo Investigations of the Effect of Short- and Long-Term Recombinant Growth Hormone Treatment on DNA-Methylation in Humans. *PLoS One* 2015, **10**:1–15.**

30. Zamani M, Berenjian A, Hemmati S, Nezafat N, Ghoshoon MB, Dabbagh F, Mohkam M, Ghasemi Y: **Cloning, Expression, and Purification of a Synthetic Human Growth Hormone in *Escherichia coli* Using Response Surface Methodology. *Mol Biotechnol* 2014, **57**:241–250.**

31. Kim M-J, Park HS, Seo KH, Yang H-J, Kim S-K, Choi J-H: **Complete**

Solubilization and Purification of Recombinant Human Growth Hormone Produced in *Escherichia coli*. *PLoS One* 2013, **8**:1–8.

32. Hsiung M: **Expression secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*.** *FEBS Lett* 1986, **204**:145–150.

33. Mukhija R, Rupa P, Pillai D, Garg LC: **High-level production and one-step purification of biologically active human growth hormone in *Escherichia coli*.** *Gene* 1995, **165**:303–306.

34. Koo TY, Park TH: **Expression of Recombinant Human Growth Hormone in a Soluble Form in by Slowing Down the Protein Synthesis Rate.** *Microbiol Biotechnol* 2007, **17**:579–585.

35. Sockolosky JT, Szoka FC: **Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone.** *Protein Expr Purif* 2013, **87**:129–135.

36. Al-Hawash AB, Zhang X, Ma F: **Strategies of codon optimization for high-level heterologous protein expression in microbial expression systems.** *Gene Reports* 2017:46–53.

37. French C, Keshavarz-Moore E, Ward JM: **Development of a simple method for the recovery of recombinant proteins from the *Escherichia coli* periplasm.** *Enzyme Microb Technol* 1996, **19**:332–338.

38. Arthur M: **Regulation of Bacterial Peptidoglycan Polymerization.** *Trends in Microbiology* 2016:519–521.

39. Mooney JT, Fredericks DP, Zhang C, Christensen T, Jespergaard C, Schiødt CB, Hearn MTW: **Purification of a recombinant human growth hormone by an integrated IMAC procedure.** *Protein Expr Purif* 2014, **94**:85–94.
40. Kimple ME, Brill AL, Pasker RL: **Overview of Affinity Tags for Protein Purification.** *Curr Protoc Protein Sci* 2013, **73**:Unit-9.9.
41. Vergis JM, Wiener MC: **The variable detergent sensitivity of proteases that are utilized for recombinant protein affinity tag removal.** *Protein Expr Purif* 2011, **78**:139–142.
42. Young CL, Britton ZT, Robinson AS: **Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications.** *Biotechnol J* 2012, **7**:620–634.
43. Fong BA, Wu WY, Wood DW: **The potential role of self-cleaving purification tags in commercial-scale processes.** *Trends in Biotechnology* 2010:272–279.
44. Shi Y, Mowery RA, Ashley J, Hentz M, Ramirez AJ, Bilgicer B, Slunt-Brown H, Borchelt DR, Shaw BF: **Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control surfactant binding.** *Protein Sci* 2012, **21**:1197–1209.
45. Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM: **Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins.** *Proc Natl Acad Sci* 2009, **106**:1760–1765.

46. Low KO, Muhammad Mahadi N, Md. Illias R: **Optimisation of signal peptide for recombinant protein secretion in bacterial hosts.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2013, **97**:3811–3826.